Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II,
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof.Dr.med. Hans Günter Goslar

Einfluß von organischen Substanzen mit C-Dreifach- und C-Doppelbindung auf die histochemische Darstellung der freien NH_2-Gruppen mit Hilfe der Orthodiacetylbenzol-Reaktion.

Untersuchungen an Leber-und Nierenschnitten der Wistarratte.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Henryk Gelbert

1983

Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II,
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof.Dr.med. Hans Günter Goslar

Einfluß von organischen Substanzen mit C-Dreifach- und C-Doppelbindung auf die histochemische Darstellung der freien NH_2-Gruppen mit Hilfe der Orthodiacetylbenzol-Reaktion.
Untersuchungen an Leber-und Nierenschnitten der Wistarratte.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Henryk Gelbert

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Brüster

Referent

gez.: Prof.Dr.Goslar

Korreferent

gez.: Priv.-Doz.Dr.Soboll

Meiner Mutter gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0014

Seite

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 6

2.1 Tiermaterial und Organentnahme 6
2.2 Histochemische Methode zum Nachweis der freien Aminogruppen 6
2.3 Substanzen zum Blockungsnachweis der freien Aminogruppen 6
2.3.1 C-Dreifachbindung enthaltende organische Verbindungen 7
2.3.2 C-Doppelbindung enthaltende organische Verbindungen (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen)..... 7
2.3.3 Succinimid,N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat 11
2.3.4 Lösungsvermittler 11
2.3.5 Vorbereitung der Inkubationslösung 12
2.4 Auswertung der Ergebnisse 12

3. Ergebnisse 13

3.1 Nachweis der freien Aminogruppen in Leber und Niere der Ratte (Kontrolle) 13
3.2 Blockungsversuche mit C-Dreifachbindung enthaltenden organischen Verbindungen .. 13
3.3 Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen) 22
3.4 Blockungsversuche mit Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat 54

4. Diskussion 59

4.1 Allgemeine Bemerkungen 59
4.2 Besprechung der Ergebnisse über C-Dreifachbindung enthaltende organische Verbindungen. 63
4.3 Besprechung der Ergebnisse über C-Doppelbindung enthaltende Verbindungen (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen).. 63
4.4 Besprechung der Ergebnisse über Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat 65
4.5 Anmerkungen zu den methodischen Parametern. 67

5. Zusammenfassung 69

6. Literaturverzeichnis 71

1. Einleitung

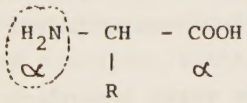
Die histochemischen Nachweismethoden für Aminosäuren können in allgemeine und spezielle Gruppenreaktionen eingeteilt werden. Zu den allgemeinen Reaktionen für alle Aminosäuren zählen:

1). Reaktion auf-NH_2-Gruppen
2). Reaktion auf-COOH-Gruppen
3). Reaktion auf-SS-und-SH-Gruppen

Zu den speziellen, an eine bestimmte Aminosäurenstruktur gebundene Reaktionen gehören:

1). Reaktion auf Tyrosin
2). Reaktion auf Tryptophan
3). Reaktion auf Histidin
4). Reaktion auf Arginin

Zusätzliche Differenzierungen sind durch die Blockungsreaktionen einzelner Gruppen möglich (s.Pearse,1968). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem histochemischen Nachweis der α-NH_2-Gruppen (primäre Amine), welche in Proteinen frei bzw. als Salzbindungen vorkommen (Weiss et al,1953, Buddecke,1977).



Alle Aminosäuren haben α- Aminogruppen und α-Carboxylgruppen, die COOH-Gruppe ist charakterisiert von pK_a 2-3 (d.h. der Wert, bei dem die Gruppe halb dissoziiert und halb assoziiert ist), die NH_2-Gruppe hat den pK_a-Wert ca. 10.
Die Aminosäuren verhalten sich dipolar oder als Zwitterionen zwischen den pH 4-9.

Der isoelektrische Fokussierungspunkt (I.P.) liegt zwischen dem pK_a von COOH und pK_a von NH_2.

$$I.P. = \frac{pK_a NH_2 + pK_a COOH}{2}$$

Zusätzlich spielen die Seitenketten je nach ihren sauren oder basischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der

Bestimmung des I.P.'s. Somit ist der I.P. stets ein Indiz unter anderem für die Zahl der freien α-NH_2-Gruppen (je höher der I.P., umso mehr freie NH_2-Gruppen kommen vor).

Zum Nachweis der α-NH_2-Gruppen stehen mehrere histochemische Methoden zur Verfügung. Im folgenden Abschnitt werden die häufigsten angewandten Methoden kurz skizziert (s. auch Pearse,1968):

1). Ninhydrin-Reaktion (Fotakis,196o)

Bei dieser Reaktion wird die NH_2-Gruppe der α-Aminosäure nach einer Reaktion mit einem Molekül Ninhydrin zu NH= dehydriert und in einem anderen Schritt bilden sich nach Abspaltung von Ammoniak und Kohlendioxyd eine Aldehydgruppe.Es entsteht am Ende der Reaktion ein blaugefärbtes Endprodukt.

2). Alloxan-Methode (Fotakis,196o)

Das Prinzip beruht auf einer Kondensierung des Alloxans mit NH_2-Gruppen, wobei ein Farbprodukt entsteht.Die Spezifität dieser Methode ist umstritten, da Alloxan auch mit SH-Gruppen reagiert.

3). Dinitrofluorbenzol-(DNFB) und Isocyanatmethode (Sanger,1945)

Diese Methode wurde besonders zum Nachweis der End-NH_2- Gruppen (N-terminale α-NH_2) eingeführt. Danielli 1947,195o) hatte diese Methode histochemisch angewandt. DNFB reagiert auch mit ε-NH_2-Gruppen des Lysins und Hydroxylysins und mit der Phenolhydroxylgruppe des Tyrosins und SH-Gruppe des Cysteins.Porter (195o) stellte fest, daß DNFB auch mit der Imidazolgruppe des Histidins reagiert. Das Endprodukt nach einer Reaktion mit den α-NH_2-Gruppen führt zu gelber Färbung.

4). Azomethin-Methode (Danielli,195o)

Diese Methode beruht auf Bildung von Azomethin oder

Schiff-Basen, wenn die Aldehyde mit primären Aminen kondensieren. Durch die Methode können auch ε-NH_2-Gruppen des Lysins, δ-NH_2-Gruppen des Ornithins und α-NH_2-Gruppen der terminalen Aminosäuren nachgewiesen werden.

5). 3-Hydroxy-2-Naphthaldehyd-Echtblausalz B (HNA)-Methode (Weiss et al,1954)
Eine andere Möglichkeit der Azomethinreaktion wurde von Weiss et al eingeführt. Diese Methode basiert auf Reaktion der primären NH_2-Gruppen mit HNA und Bildung von Schiff-basen; dies führt nach Kopplung mit tetrazotiertem Diorthoanisidin zur rot bis blauen Färbung der Orte mit NH_2-Gruppen.

6). o-Diacetylbenzol-Reaktion (o-DAB) (Voss, 1941;Dietz,1942;Wartenberg,1956)
Diese Reaktion gilt als eine empfindliche und spezifische Methode zum histochemischen Nachweis der freien NH_2-Gruppen. Wartenberg veröffentlichte umfaßende Studien über die o-DAB Anwendung. Nach Pearse (1968) scheint das Prinzip dieser Reaktion Ähnlichkeit mit der Bildung von Phthalocyaninen zu haben; der Reaktionsmechanismus im einzelnen ist noch weitgehend unbekannt.

7). Acrolein-Schiff-Reaktion (van Duijn,196o)
Dies ist eine cytochemische Methode, die auf einer kombinierten Reaktion von Acrolein und Schiffreagenz mit dem Gewebe basiert. Hierbei reagieren nach van Duijn die Doppelbindungen des Acroleins mit aliphatischen primären bzw. sekundären NH_2- Gruppen sowie mit dem Iminostickstoff des Imidazolringes.

8). Tetrazonium-Reaktion (Danielli,1947,195o)
Diese Methode von Danielli (s.Pearse,Bd.I,S.127,1968) wird angewandt, um Tyrosin,Tryptophan und Histidin nachzuweisen. Sie beruht auf einer Reaktion der Amino-

säure mit tetrazotiertem Benzidin bei 4°C, pH 9,0 mit anschließender Kopplung der freien Diazoniumgruppen mit phenolhaltigen oder aromatischen Aminen.

9). König-Sassi-Reaktion (Stoward,1963)
Diese biochemische Methode hatte Stoward histochemisch angewandt. Das Prinzip beruht auf einer Inkubation der Gewebeschnitte mit Pyridin, wobei mit Cyanbromid (Br-CN) eine intensive grüne Fluoreszenz erzeugt wird.

10). Chloramin-T-Methode (Chu et al.,1953)
Chu et al. führten eine neue Methode ein, die auf einer oxydativen Desaminierung von Aminosäuren durch Chloramin-T (Natrium-p-toluol-sulfochloramin) oder Na-Hypochlorit basiert.
Die o-DAB-Reaktion wurde von mehreren Autoren als eine empfindliche, zuverlässige Methode gewertet (Dietz,1942; Wartenberg,1956; Goslar,1963). Weygand et al. (1956) haben festgestellt, daß der Einwand, die o-DAB-Reaktion reagiere auf alle freien NH_2-Gruppen und damit nicht nur auf die Aminosäuren bedingt zutrifft. Goslar (1963) verglich anhand von Nierenschnitten die o-DAB-Reaktion mit u.a.: 3-Hydroxy-2-Naphthaldehyd-Echtblausalz B-, Ninhydrin-Schiff-, Tetrazonium- und Acrolein-Schiff-Reaktion und stellte erneut ihre hohe Spezifität fest.
Die o-DAB-Reaktion übertrifft an Spezifität und geringer Veränderungen des Präparates die anderen genannten und allenfalls die HNA kann ihr noch in etwa gleich gesetzt werden. Der Ninhydrin-Schiff-Reaktion ist die o-DAB-Reaktion wegen ihrer kurzen Reaktionszeit überlegen.
Die Tetrazonium-Reaktion kann nur als recht unspezifische Proteinnachweismethode angesehen werden. Für die Acrolein-Schiff-Reaktion liegen keine eindeutigen Beweise für eine elektive Erfassung freier NH_2-Gruppen vor.

In der Literatur ist über die Beeinflussung der o-DAB-Reaktion durch verschiedene Substanzen wenig berichtet worden. Nach Untersuchungen von Goslar (1963) bewirkten Salpetersäure, Dinitrofluorbenzol und N-Äthylmaleimid (s. auch Pearse,Bd.I,1968) eine völlige Blockung der o-DAB-Reaktion. Geyer (1963) stellte fest, daß N-Bromsuccinimid die o-DAB-Reaktion vollständig blockiert. Das Benzoylchlorid führt zu einer Abschwächung der o-DAB-Reaktion, wie Goslar (1963) anhand von Nierenschnitten zeigte. Eine saure Hydrolyse, also eine Lösung der Säureamidbindung, verstärkt die Farbintensität der o-DAB-Reaktion. Die Vorbehandlung mit Bromwasser führt nach Goslar (1963) ebenfalls zur völligen Blockung der o-DAB-Reaktion.

Aus der o.a. Literatur ist es ersichtlich, daß die Frage des Blockungsmechanismus für die histochemische Darstellung der freien NH_2-Gruppen durch die o-DAB-Reaktion noch nicht ausreichend geklärt ist.Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Substanzen mit Dreifach-, bzw. Doppelbindung in der C-Kette sowie mit aktiven Endgruppen hinsichtlich ihrer Blockungswirkung zur histochemischen Darstellung der freien NH_2-Gruppen mittels o-DAB-Reaktion anhand von Leber- und Nierenschnitten von Wistarratten zu untersuchen.
In den vorliegenden Untersuchungen sind auch einige Substanzen einbezogen, die bekanntlich deutliche toxische Eigenschaften besitzen und in der Lage sind, entweder die Gewebsstrukturen durch Denaturierung der Eiweiße zu zerstören oder wichtige interzelluläre Stoffwechselfunktionen partiell bzw. völlig zu blockieren (Forth et al, 198o).

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial und Organentnahme

Die Versuche wurden an Leber und Niere von männlichen Wistarratten mit einem Gewicht von ca. 2oo g durchgeführt, welche den mit Äther narkotisierten Tieren entnommen waren. Es erfolgte eine Aufteilung in Stückchen von jeweils 3X1o mm Kantenlänge und anschließende Fixierung in einem Äthanol-Eisessiggemisch nach Wolman und Behar (1952) (s.Romeis,§225,1968).

2.2. Histochemische Methode zum Nachweis der freien Aminogruppen

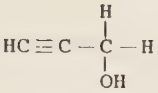
Für die Nachweise der freien Aminogruppen dienten ca. 6 µm dicke Paraffinschnitte. Zum Nachweis der freien Aminogruppen diente die Orthodiacethylbenzol-Reaktion (o-DAB) in der Durchführung nach Wartenberg (1956). Das Orthodiacethylbenzol wurde in absolutem Äthanol gelöst, mit o,1 M Veronal-Acetat-Puffer (nach Michaelis) pH 8,2 versetzt. Der End-pH-Wert der Lösung betrug 8,2. Die frisch hergestellte Reagenzlösung pH 8,2 wurde auf die Schnitte aufgetropft und für 6o Minuten bei 2o^{o}C in einer feuchten Kammer belassen. Nach der Beendigung der Reaktion wurden die Schnitte in o,1 M Veronal-Acetat-Puffer pH 7,o für 1o Minuten bei 2o^{o}C gewaschen, über eine aufsteigende Alkoholreihe gebracht und mit Entellan eingedeckt.

2.3. Substanzen zum Blockungsnachweis der freien Aminogruppen

Folgende Substanzen werden für die Blockungsversuche angewandt:

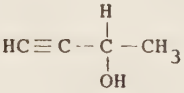
2.3.1. C-Dreifachbindung enthaltende organische Verbindungen.

2-Propin-1-ol

C_3H_4O ; 

ist eine farblose,angenehm riechende Flüssigkeit mit einer hautreizender Wirkung.Der dreifach,ungesättigte aliphatische Alkohol ist in Wasser,Äthanol und Äther löslich. MG 56,o6.

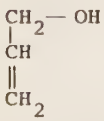
3-Butin-2-ol

C_4H_6O ; 

ist ein klarer,farbloser bis schwach gelblicher, angenehm riechender, dreifach ungesättigter Alkohol, der mit Wasser mischbar ist. MG 7o,o9.

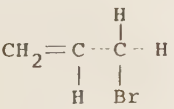
2.3.2. C-Doppelbindung enthaltende organische Verbindungen. (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen)

Allylalkohol

C_3H_6O ; 

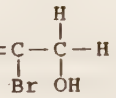
Der ungesättigte Alkohol ist eine brennbare, farblose, giftige, bewegliche Flüssigkeit von heftig reizendem Geruch. Mit Wasser und den gewöhnlichen organischen Lösungsmittel ist er in jedem Verhältnis mischbar. MG 58,o8.

3-Brom-1-propen

C_3H_5Br ; 

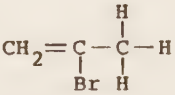
ist eine farblose, übel riechende Flüssigkeit mit Augen und Atemwege reizender Wirkung. Sie ist in Wasser wenig, dagegen in Alkohol,Äther, Chloroform gut löslich. MG 12o,98.

2-Brom-2-propen-1-ol

C_3H_4OBr ; 

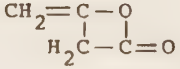
ist eine farblose unangenehm riechende Flüssigkeit, die in organischen Lösungsmittel löslich ist. MG 136.

2-Brom-propen

C_3H_5Br ; 

ist eine farblose übel riechende Flüssigkeit. Sie reizt Augen und Atemwege. Löslich in organischen Lösungsmitteln. MG 12o.98.

Keten dimer

$C_4H_4O_2$; 

Diese Verbindung ist eine flüchtige Flüssigkeit, die zu den reaktionsfähigsten Stoffen der organischen Chemie gehört. Sie ist in organischen Lösungsmitteln löslich, wird aber durch Wasser zersetzt. MG 94,o6.

Heptensäure

$C_7H_{12}O_2$; $H_2C{=}CH{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}COOH$

ist eine farblose Flüssigkeit mit sehr schwach sauren Eigenschaften. Sie ist in Wasser wenig, in Alkohol gut löslich.MG 129,16.

Maleinsäure

$C_4H_4O_4$; $\begin{matrix} H-C-COOH \\ \| \\ H-C-COOH \end{matrix}$

liegt in Form weißer Nadeln vor. Sie ist in Wasser, sowie Äthanol leicht löslich. MG 116,o7.

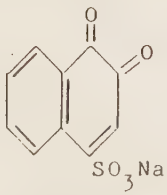
Sorbinsäure

$C_6H_8O_2$; $CH_3{-}CH{=}CH{-}CH{=}CH{-}COOH$

liegt in Form weißer Kristallnadeln vor. Sie ist in heißem Wasser, sowie in Alkohol und Äther leicht löslich. MG 112,12.

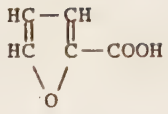
1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure-Natriumsalz

$C_{1o}H_5NaO_5S$;



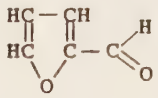
Diese Verbindung liegt in Form orange-farbiger Kristalle vor. Sie ist in Wasser,Alkohol,Äther und Chloroform löslich. MG 26o,2o.

Furan-2-carbonsäure

$C_5H_4O_3$; 

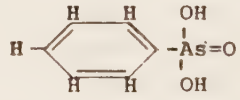
ist eine farblose,chloroformartig riechende, leicht entflammbare Flüssigkeit.Sie ist in Äthanol,Benzin leicht löslich. MG 112,o6.

Furfurol

$C_5H_4O_2$; 

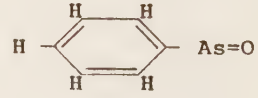
ist in reinem Zustand ein farbloses,flüchtiges Öl, das in Wasser, besser aber in Äther,Äthanol,Aceton löslich ist. MG 98,o8.

Phenylarsonsäure

C_6H_5-AsO(OH)$_2$; 

die weißen,giftigen Kristalle der Phenylarsonsäure sind in Äthanol,sowie in heißem Wasser gut löslich. MG 2o2,o4.

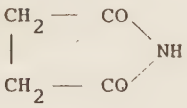
Phenylarsinoxid

C_6H_5-As=O ; 

Die weißen, giftigen Kristalle des Phenylarsinoxides sind in Aceton und Chloroform gut löslich. MG 168,o3.

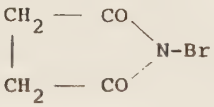
2.3.3. Succinimid,N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat

Succinimid

$C_4H_5NO_2$; 

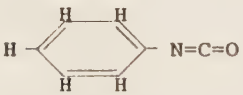
liegt in Form von farblosen Nadeln oder Tafeln vor. Es ist in Wasser, Äthanol,Äther löslich. MG 99,09.

N-Bromsuccinimid

$C_4H_4BrNO_2$; 

liegt in Form von farblosen orthorhombischen,bisphenoidalen Kristallen vor. Es ist in Wasser,Äther,Benzol nur wenig löslich,leichter löslich in Aceton und Äthylacetat. MG 178.

Phenylisocyanat

C_7H_5NO ; 

ist eine farblose,übel riechende Flüssigkeit,die durch eine kumulierte Doppelbindung sehr reaktionsfähig ist. Es wird durch Wasser zersetzt. MG 119,12.

2.3.4. Lösungsvermittler

Um auszuschließen,daß eine eventuelle Blockung auf die Lösungsvermittler zurückzuführen ist, werden die Schnitte mit den unten genannten vorbehandelt und anschliessend durch die o-DAB-Reaktion der Nachweis der freien Aminogruppen geführt. Es werden folgende Lösungsvermittler angewandt:

Aqua dest.

abs. Äthanol

Aceton
Äther
Veronal Acetat Puffer (pH 7,o und pH 8,2)
Trispuffer (pH 3,3; pH 4,4; pH 5,9)
Nach Vorbehandlung der Schnitte mit den genannten Lösungsvermittlern können im Vergleich zur Kontrolle keine Ausfälle der o-DAB-Reaktion festgestellt werden. Die Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen ist dem Normalbild zu entnehmen.

2.3.5. Vorbereitung der Inkubationslösungen

Die Verbindungen werden in verschiedenen Konzentrationen, im sauren und neutralen Milieu angewandt. Die Neutralisation der Lösungen erfolgt mit 1N NaOH bzw. o,1N NaOH. Die Vorbehandlungszeit beträgt 4 Stunden bei Raumtemperatur.

2.4. Auswertung der Ergebnisse

Die Schnitte werden lichtmikroskopisch ausgewertet und photographisch dokumentiert. Die histochemische Wirkung der angewandten Substanzen wird bei den Blockungsversuchen nach folgenden Graden erfaßt und beurteilt.

VB = völlige Blockung der o-DAB-Reaktion
A = Abschwächung der o-DAB-Reaktion
N = keine Veränderung gegenüber der Kontrolle (Normalbild)
V = Verstärkung der o-DAB-Reaktion

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der freien Aminogruppen in Leber und Niere der Ratte (Kontrolle).

Leber

Die Kontrolle (Abb.1) zeigt einen rot-violetten, homogenen Farbton des Cytoplasmas der Leberzellen. Die Kernstrukturen sind stellenweise stärker tingiert als das umgebende Cytoplasma. Das periportale Bindegewebe ist schwach, jedoch deutlich positiv angefärbt. Die Gefäßwände der Vv. centrales besonders aber die der Vv. interlobulares, sind stark violett tingiert.

Niere

In den Glomeruli sind die Kapillarwände sowie die Zellen des Mesangiums rot-violett angefärbt (Abb.2). Das gleiche gilt für die Bowmansche Kapsel. In den Hauptstücken erscheint das Cytoplasma der Zellen stark, der Bürstensaum nur gering positiv. Ein Unterschied im Bereich der Hauptstücke besteht nicht. Die Mittel-, Überleitungsstücke und Sammelrohrepithelien sind schwach jedoch deutlich angefärbt. Die Gefäßwände sind stark violett tingiert.

3.2. Blockungsversuche mit C-Dreifachbindung enthaltenden organischen Verbindungen.

3.2.1. 2-Propin-1-ol
Versuch 1oo% pH 5,8 und pH 7,o

Leber

Nach 1oo% 2-Propin-1-ol Vorbehandlung im sauren Milieu von pH 5,8 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o stellt sich eine völlige Blockung ein,

Abb. 1 - 17
6 µm Paraffinschnitte von Leber und Niere der Wistarratte. Histochemische Darstellung der freien Aminogruppen mittels Orthodiacetylbenzol-Reaktion
(O-DAB-Reaktion).
Vergrößerung: Obj. X 4o
Endvergrößerung: X 53o

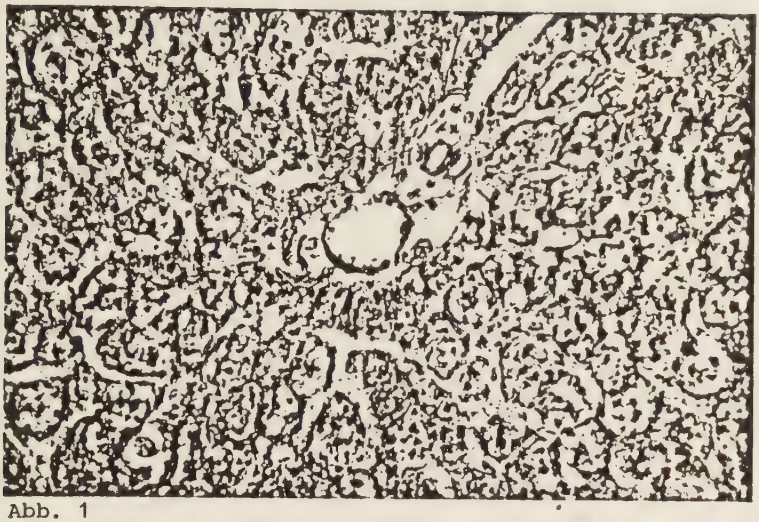


Abb. 1
Leber.Kontrolle d.h. ohne Vorbehandlung mit einer Blockungssubstanz. Die freien Aminogruppen sind rot-violett angefärbt. X 530.

Abb. 2
Niere. Kontrolle d.h. ohne Vorbehandlung mit einer Blockungssubstanz.Die freien Aminogruppen sind rot-violett angefärbt. X 530.

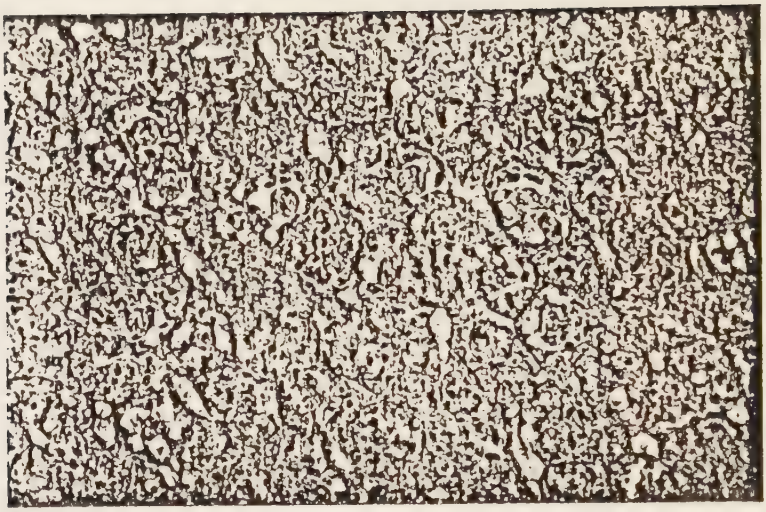


Abb. 3
Leber. Blockungsversuch: 2-Propin-1-ol, 1oo%, pH 5,8. Das Bild dokumentiert eine völlige Blockung der freien Aminogruppen. X 530.

Abb. 4
Niere.Blockungsversuch: 2-Propin-1-ol, 1oo%, pH 5,8. Das Bild weist eine völlige Blockung der freien Aminogruppen auf. X 530.

die durch eine leicht gelb-grüne Tingierung gekennzeichnet ist (Abb.3).Diese erstreckt sich auf alle Gewebsbereiche.

Versuch 5o% gelöst in Aqua dest. pH 8,4

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 8,4 stellt sich im Cytoplasma der Leberzellen eine völlige Blockung ein. Lediglich Kernstrukturen sowie interlobuläres Bindegewebe erscheinen im Vergleich zur Kontrolle nur sehr schwach violett tingiert. Die Gefäßwände im Bereich der Glissonschen Felder sind schwach violett angefärbt.

Versuch 5o% pH 7,o

Das Ergebnis durch Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im neutralen Milieu ist analog, wie bereits im Versuch 5o% pH 8,4 erwähnt.

Versuch 25% pH 8,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 25%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 8,o bewirkt eine starke Abnahme der Aktivität. Es stellt sich eine schwach violette Farbtönung ein. Die Kernstrukturen sind deutlich positiver als das umgebende Cytoplasma. Das interlobuläre Bindegewebe erscheint nur noch sehr schwach positiv.Dagegen zeichnen sich die Gefäßwände im Bereich der Glissonfelder vergleichsweise zu den übrigen Strukturen durch leichte Zunahme der Positivität aus.

Versuch 25% pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit 25%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt gleichermaßen eine leichte Zunahme der Positivität gegenüber 25% pH 8,o, jedoch viel schwächer als im Normalbild.

Versuch 5% pH 7,6 und pH 7,o

Die Vorbehandlung mit 5%-Lösung jeweils im alkalischen Milieu von pH 7,6 und im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt im Vergleich zum Kontrollbild keine Tingierungsunterschiede. Die Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen ist dem Normalbild zu entnehmen.

Niere

Versuch 1oo% pH 5,8 und pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einem 1oo% 2-Propin-1-ol im sauren Milieu von pH 5,8 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o läßt die o-DAB-Reaktion negativ werden(Abb.4). Die Blockung erstreckt sich auf alle Gewebsbereiche. Das Gewebe weist einen gelblich-grünen Farbton auf.

Versuch 5o% pH 8,4

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 8,4 stellt sich im Cytoplasma der Haupt-und Überleitungsstücke eine völlige Blockung ein. Lediglich vereinzelte Kernstrukturen zeigen eine Restpositivität.Die Sammelrohrepithelien sind nur sehr schwach violett angefärbt. Die Kapillarwände in den Glomeruli und die Gefäßwände sind ebenfalls sehr schwach tingiert.

Versuch 5o% pH 7,o

Nach Vorbehandlung mit 5o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o fällt im Vergleich zum Kontrollbild in allen Gewebsbereichen die o-DAB-Reaktion sehr schwach positiv aus. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli und die Bowmansche Kapsel sind zwar stärker tingiert als die Zellen des Mesangiums, aber im Vergleich zur Kontrolle nur sehr schwach positiv angefärbt. Dagegen erscheinen die Haupt-und Überleitungsstücke sowie

Sammelrohrepithelien schwach positiv. Die Gefäßwände sind deutlich, jedoch schwach violett tingiert.

Versuch 25% pH 8,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 25%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 8,o bewirkt bei der anschließenden o-DAB-Reaktion im Vergleich zum Normalbild eine starke Abnahme der Positivität. Die Kapillarwände in den Glomeruli und die Bowmansche Kapsel sind schwach violett angefärbt. Das gleiche gilt auch für die Gefäßwände. Die Haupt- und Überleitungsstücke sind schwach tingiert, jedoch stärker positiv als die Sammelrohrepithelien.

Versuch 25% pH 7,o

Das Resultat durch Vorbehandlung der Schnitte mit einer 25%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o ist analog, wie bereits im Versuch 25% pH 8,o erwähnt.

Versuch 5% pH 7,6 und pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 7,6 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt gegenüber der Kontrolle keine Tingierungsunterschiede. Dies bezieht sich auf alle Zell-und Gewebsstrukturen. Eine weitere Differenzierung ist dem Normalbild zu entnehmen.

Zusammenfassung:

Das 2-Propin-1-ol bewirkt nur im unverdünnten Zustand eine Blockung der freien Aminogruppen. Eine 5o% Konzentration dieser Substanz blockiert zwar freie Aminogruppen im Cytoplasma der Leber- und Nierenzellen, läßt aber die Zellkerne leicht positiv erscheinen. Eine 5% Konzentration zeigt keine Blockung der o-DAB-Reaktion (Tab.1).

3.2.2. 3-Butin-2-ol

Leber

Versuch 5o% pH 3,3

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,3 kann im Vergleich zum Normalbild kein Unterschied festgestellt werden.

Versuch 5o% pH 6,97

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,97 zeigt sich dagegen bei zahlreichen Kernstrukturen und der umgebenden Cytoplasma eine leichte Abschwächung der Positivität gegenüber der Kontrolle. Die Gefäßwände sind jedoch stark violett tingiert. Die bindegewebigen Glisson-felder sind nur schwach violett angefärbt.

Versuch 25% gelöst in Äthanol-Aqua dest.-Gemisch pH 4,6

Das Resultat durch Vorbehandlung der Schnitte mit einer 25%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,6 entspricht weitgehend der Kontrolle.

Versuch 25% pH 7,o

Im Gegensatz zu dem vorhergehenden Versuch ist die Vorbehandlung mit 25%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o durch eine leichte Abschwächung der o-DAB-Reaktion gekennzeichnet.

Versuch 5% pH 5,9 und pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 5,9 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt gegenüber der Kontrolle keine Tingierungs-und Differenzierungsunterschiede.

Niere

Versuch 5o% pH 3,3

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,3 kann im Vergleich zur Kontrolle hinsichtlich der Tingierung und Differenzierung kein Unterschied festgestellt werden.

Versuch 5o% pH 6,97

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,97 ergibt gegenüber der Kontrolle eine leichte Abschwächung der o-DAB-Reaktion. Dies ist besonders in den Sammelrohrepithelien der Fall. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind im Vergleich zur Kontrolle schwach angefärbt. Die Glomeruli mit ihrem Kapillarbündel,Zellen des Mesangiums sowie die Bowmansche Kapsel weisen eine mittelstarke Tingierung auf.

Versuch 25% pH 4,6

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 25%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,6 hat eine leichte Abschwächung der o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle zur Folge. Dieses bezieht sich auf alle Zell-und Gewebsstrukturen.

Versuch 25% pH 7,o

Durch die Vorbehandlung mit einer 25%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o im Vergleich zur Kontrolle, fällt die anschließende o-DAB-Reaktion normal bis leicht abgeschwächt, positiv aus.

Versuch 5% pH 5,9 und pH 7,o

Das Ergebnis der Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung sowohl im sauren Milieu von pH 5,9, als auch im neutralen Milieu von pH 7,o entspricht

bezüglich der Tingierung sowie der Differenzierung einzelner Strukturen der Kontrolle.

Zusammenfassung:
Die Blockungsversuchsreihe mit 3-Butin-2-ol zeigt, daß die Vorbehandlung mit diesem Alkohol allenfalls zu einer leicht abgeschwächten, meistens aber normalen o-DAB-Reaktion führt (Tab.1).

3.3. Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen).

3.3.1. Allylalkohol

Leber

Versuch 1oo% pH 3,1

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1oo%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,1 treten die Kernstrukturen im Vergleich zum umgebenden Cytoplasma stark positiv hervor. Das interlobuläre Bindegewebe ist im Vergleich zum Normalbild wesentlich stärker angefärbt. Ebenfalls zeigen die Gefäßwände eine stärker positiv braun-violette Tingierung als bei der Kontrolle.

Versuch 1oo% pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1oo%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o zeigt eine wesentliche Steigerung der Positivität in einem braun-violetten Farbton. Die o-DAB-Reaktion fällt besonders stark im Bereich der Gefäßwände aus. Das Bindegewebe im Bereich der Glissonfelder ist nur mäßig tingiert.

Tabelle 1. Befunde der Blockungsversuche mit C-Dreifachbindung enthaltenden organischen Verbindungen.

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
2-Propin-1-ol	100 %	5,8	VB	VB
	100 %	7,0	VB	VB
	50 %	8,4	VB-A	VB-A
	50 %	7,0	VB-A	A
	25 %	8,0	A	A
	25 %	7,0	A	A
	5 %	7,6	N	N
	5 %	7,0	N	N-A
3-Butin-2-ol	50 %	3,3	N	N
	50 %	6,97	N-A	N-A
	25 %	4,6	N-A	N-A
	25 %	7,0	N-A	N-A
	5 %	5,9	N	N
	5 %	7,0	N	N

Erklärung der Bezeichnungen:

1). VB= völlige Blockung der o-DAB-Reaktion
2). A = Abschwächung der o-DAB-Reaktion
3). N = keine Veränderung gegenüber der Kontrolle (Normalbild)
4). V = Verstärkung der o-DAB-Reaktion

Die oben genannten Bezeichnungen gelten auch für die Tabellen 2-6.

Versuch 5o% gelöst in Aqua dest. pH 3,8 und pH 6,95

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung sowohl im sauren als auch im neutralen Milieu zeigt gleichermaßen eine deutliche Verstärkung der Positivität gegenüber der Kontrolle (Abb.5). Dies betrifft alle Gewebsbereiche.

Versuch 2o% pH 4,o und pH 6,95

Bei den mit 2o%-Lösung vorbehandelten Schnitten sowohl im sauren Milieu als auch im neutralen Milieu zeigt sich gegenüber der Kontrolle eine leichte Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Farbton wie in Abb.5.

Versuch 5% pH 4,3 und pH 7,o

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,3 und im neutralen Milieu von pH 7,o im Vergleich zum Normalbild, fällt die anschließende o-DAB-Reaktion normal bis leicht verstärkt positiv aus. Farbton wie in Abb.5.

Niere

Versuch 1oo% pH 3,1

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 1oo%-Allylalkohol im sauren Milieu von pH 3,1 fällt die o-DAB-Reaktion im Vergleich zum Normalbild deutlich stärker positiv aus. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli, die Zellen des Mesangiums und die Bowmansche Kapsel sind stärker tingiert, als im Kontrollbild und sind durch eine dunkelbraunviolette Färbung gekennzeichnet. Die Haupt- und Überleitungsstücke sind gleichmäßig stark angefärbt. Die Sammelrohrepithelien dagegen nur schwach positiv jedoch deutlich tingiert. Die Gefäßwände sind stark braunviolett angefärbt.

Versuch 1oo% pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit 1oo%-Allylalkohol im neutralen Milieu von pH 7,o bewirkt ebenfalls gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der anschließenden o-DAB-Reaktion.

Versuch 5o% pH 3,8 und pH 6,95
2o% pH 4,o und pH 6,95
5% pH 4,3 und pH 7,o

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit den 5o%,2o% und 5%-Lösungen im sauren sowie im neutralen Milieu fällt die o-DAB-Reaktion erheblich stärker positiv aus, als bei der Kontrolle (Abb.6).

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit Allylalkohol in Konzentrationen von 1oo%,5o% und 2o% unabhängig vom pH-Wert führt zur deutlichen Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Die dabei erzielte dunkelbraun-violette Färbung unterscheidet sich erheblich von der rot-violetten Tingierung der Kontrollschnitte. Lediglich eine 5% Konzentration des Allylalkohols bewirkt bei den Leberschnitten eine normale bis leicht verstärkte o-DAB-Reaktion (Tab.2).Nach Vorbehandlung der Nierenschnitte mit einer 5%-Lösung bleibt die dunkelbraun-violette Tingierung unvermindert stark erhalten (vergl. Abb.5 und Abb.6).

3.3.2. 3-Brom-1-propen

Leber

Versuch 1oo% pH 1,8

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einem 1oo%-3-Brom-1-propen im sauren Milieu von pH 1,8 bewirkt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion mit einer rot-violetten Tingierung (Abb.7).

Die Zunahme der Positivität ist besonders im Bereich der Gefäßwände sichtbar. Das periportale Bindegewebe ist ebenfalls stärker positiv als im Kontrollbild.

Versuch 5o% gelöst in abs.Äthanol pH 4,8 und 7,o
Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,8 und im neutralen Milieu von pH 7,o fällt die o-DAB-Reaktion im Vergleich zur Kontrolle etwas stärker positiv aus. Auch hier färbt sich das Gewebe rot-violett an.

Versuch 3o% pH 6,1 und pH 7,o
Nach Vorbehandlung der Schnitte mit den genannten Lösungen kann der gleiche Befund erhoben werden, wie bereits beim Versuch 5o% pH 4,8 und pH 7,o.

Versuch 1o% pH 5,3 und pH 7,o
Nach Vorbehandlung der Schnitte mit den genannten Lösungen kann der gleiche Befund erhoben werden, wie bereits beim Versuch 5o% pH 4,8 und pH 7,o.

Niere
Versuch 1oo% pH 1,8
Die Vorbehandlung der Schnitte mit einem 1oo% 3-Brom-1-propen im sauren Milieu von pH 1,8 bewirkt im Vergleich zum Kontrollbild eine Zunahme der Positivität im Bereich der Haupt- und Überleitungsstücke (Abb.8). Die Kapillarschlingen in den Glomeruli, die Zellen des Mesangiums und die Bowmansche Kapsel sind ebenfalls stark rot-violett tingiert. Die Sammelrohrepithelien erscheinen nur mäßig stark, jedoch deutlich angefärbt.Die Gefäßwände zeigen eine rot-violette Anfärbung.

Versuch 5o% pH 4,8 und pH 7,o

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,8 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o fällt die o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle etwas stärker positiv aus.

Versuch 3o% pH 6,1 und pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 3o%-Lösung im sauren Milieu von pH 6,1 und im neutralen Milieu von pH 7,o bewirkt ebenfalls eine leichte Zunahme der Positivität. Lediglich beim Versuch im sauren Milieu zeigt sich im Vergleich zum Versuch im neutralen Milieu eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion im Bereich der Gefäßwände .Die Färbung ist jedoch noch stärker als bei der Kontrolle.

Versuch 1o% pH 5,3 und pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 5,3 und im neutralen Milieu von pH 7,o fällt die o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle etwas stärker positiv aus. Die Haupt- und Überleitungsstücke sind stark rot-violett angefärbt. Die Sammelrohrepithelien erscheinen nur mittelstark tingiert. Die Kapillarwände in den Glomeruli, Zellen des Mesangiums und die Bowmansche Kapsel sind stärker positiv als bei der Kontrolle. Die Gefäßwände sind unvermindert stark positiv.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit 1oo% 3-Brom-1-propen führte zu einer deutlichen Verstärkung der o-DAB-Reaktion, die durch einen kräftigen, rot-violetten Farbton dokumentiert war. Die restlichen Konzentrationen ließen die o-DAB-Reaktion normal bis leicht verstärkt erscheinen (Tab.2).

3.3.3. 2-Brom-2-propen-1-ol

Leber

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 2-Brom-2-propen-1-ol (pH-Wert nicht meßbar) kann im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied der o-DAB-Reaktion festgestellt werden. Die Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen ist dem Kontrollbild zu entnehmen.

Niere

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 2-Brom-2-propen-1-ol zeigt sich auch hier kein Unterschied der Positivität gegenüber der Kontrolle. Die Kapillarwände in den Glomeruli und die Zellen des Mesangiums sind mittelstark violett angefärbt. Im Bereich der Haupt-und Überleitungsstücke ist stellenweise eine Gewebsverquellung festzustellen. Die Gefäßwände sind stark violett tingiert.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung der Leber-und Nierenschnitte mit 2-Brom-2-propen-1-ol ergab im Vergleich zum Kontrollbild keinerlei Tingierungsunterschiede. Allerdings war im Bereich der Haupt-und Überleitungsstücke eine partielle Gewebsverquellung zu beobachten (Tab.2).

3.3.4. 2-Brom-propen

Leber

Versuch 1oo% pH 6,9

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einem 1oo% 2-Brom-propen im neutralen Milieu kann im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Verstärkung der Positivität festgestellt werden. Die Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen ist in der Relation des Normalbildes zu beurteilen.

Tabelle 2. Befunde der Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen (Alkohole bzw. halogen(substituierte Verbindungen).

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
Allylalkohol	100 %	3,1	V	V
	100 %	7,0	V	V
	50 %	3,8	V	V
	50 %	6,95	V	V
	20 %	4,o	V	V
	20 %	6,95	V	V
	5 %	4,3	N-V	V
	5 %	7,o	N-V	V
3-Brom-1-propen	100 %	1,8	V	V
	50 %	4,8	N-V	N-V
	50 %	7,0	N-V	N-V
	30 %	6,1	N-V	N-V
	30 %	7,0	N-V	N-V
	10 %	5,3	N-V	N-V
	10 %	7,0	N-V	N-V
2-Brom-2-propen-1-ol	100 %	nicht meßbar	N	N

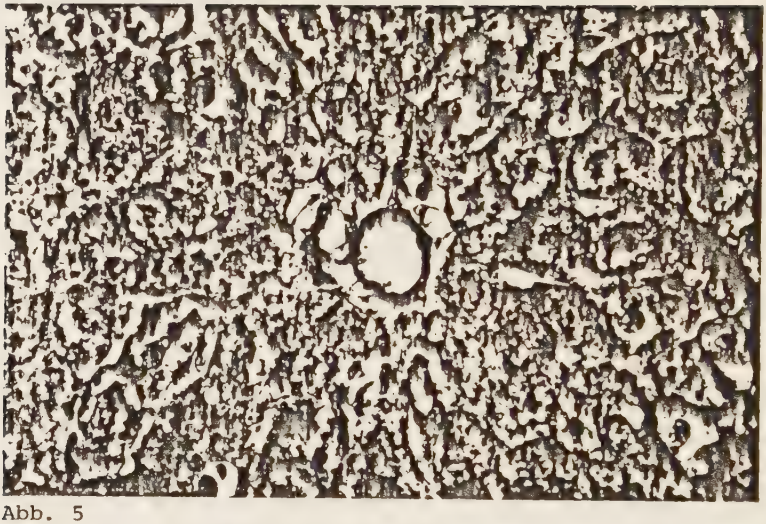


Abb. 5
Leber. Blockungsversuch: Allylalkohol, 5o%, pH 3,8. Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. X 53O.

Abb. 6
Niere. Blockungsversuch: Allylalkohol, 5o%, pH 7,o. Das Bild dokumentiert gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. X 53O.

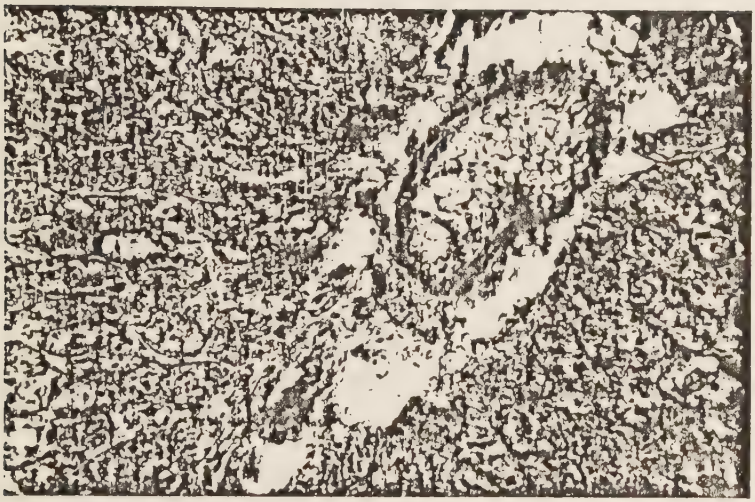


Abb. 7
Leber. Blockungsversuch: 3-Brom-1-propen, 1oo%, pH 1,8. Das Bild läßt gegenüber der Kontrolle eine Verstärkung der o-DAB-Reaktion erkennen. X 53O.

Abb. 8
Niere. Blockungsversuch: 3-Brom-1-propen, 1oo%, pH 1,8. Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine Verstärkung der o-DAB-Reaktion. X 53O.

Versuch 1o% gelöst in Äthanol-Äther-Gemisch pH 5,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Bereich von pH 5,o ergibt eine unwesentliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion in allen Gewebsbereichen. Die bindegewebigen Glissonfelder sowie die Gefäßwände erscheinen nur etwas stärker violett angefärbt gegenüber der Kontrolle.

Versuch 1o% pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o bewirkt in den Leberzellen im Vergleich zum Kontrollbild keinen Unterschied der Positivität. Lediglich stellenweise treten Kernstrukturen vergleichsweise zum umgebenden Cytoplasma nur unwesentlich positiver hervor als im Kontrollbild. Das periportale Bindegewebe ist wie im Normalbild mittelstark violett angefärbt. Ein Unterschied im Bereich der Gefäßwände besteht nicht.

Niere

Versuch 1oo% pH 6,9

Nach Vorbehandlung der Schnitte im neutralen Milieu von pH 6,9 kann im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Verstärkung der o-DAB-Reaktion festgestellt werden. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind stärker violett tingiert und weisen zahlreiche ausgesparte leer erscheinende Zellen auf. Das gleiche gilt für die mittelstark violett angefärbten Sammelrohrepithelien. Weitere Beurteilung der Zell-und Gewebsstrukturen ist in der Relation des Normalbildes zu erkennen.

Versuch 1o% pH 5,o und pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren sowie im neutralen Milieu ergibt im Vergleich zur Kontrolle hinsichtlich der Tingierung und Differenzierung keinerlei Unterschiede.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einem 1oo% 2-Brom-propen führt zur Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Bei den mit 1o% 2-Brom-propen vorbehandelten Schnitten im Vergleich zur Kontrolle, fiel die anschließende o-DAB-Reaktion normal bis leicht verstärkt aus (Tab.3).

3.3.5. Keten dimer

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 1oo% Keten dimer im sauren Milieu von pH 2,7, 5o%-Lösung pH 5,1,3o%-Lösung pH 5,8 und 1o%-Lösung im alkalischen Milieu von pH 7,7 alle gelöst in abs.Äthanol stellte sich in allen Gewebsbereichen eine völlige Blockung ein. Das gesamte Gewebe ist hell-gelb gefärbt. Die Versuche mit 1oo%,5o%,3o% und 1o%-Lösungen sind nicht durchführbar, weil sich das Keten dimer nach Zugabe von Wasser zersetzt. Nur im sauren Milieu von pH 2,7;5,1; 5,8 blieb die verdünnte Lösung stabil. Es zeigte sich hier, daß die Vorbehandlung der Schnitte mit Keten dimer bei allen Konzentrationen zur völligen Blockung der freien Aminogruppen führte (Tab.3).

3.3.6. Heptensäure

Leber

Versuch 5o% gelöst in abs. Äthanol pH 5,o

5o% pH 6,9

3o% pH 6,5

Bei diesen Versuchen färben sich die freien Aminogruppen braun-violett an. Weiterhin wird eine partielle Gewebsauflösung beobachtet (Abb.9).

Eine exakte Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen ist wegen der Gewebszerstörung nicht möglich.

Versuch 3o% pH 6,95

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 3o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,95 bewirkt eine Verstärkung der Positivität, die durch eine braun-violette Färbung gekennzeichnet ist (Abb.1o). Im Bereich der Gefäßwände fällt die o-DAB-Reaktion besonders stark aus. Das Bindegewebe im Bereich der Glissonfelder ist hier stark tingiert.

Versuch 1o% pH 3,2 und pH 6,98

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,2 sowie im neutralen Milieu von pH 6,98 fällt die o-DAB-Reaktion analog aus, wie bei der Kontrolle (Abb. 11). Auffällig ist hier die rot-violette Farbgebung im Gegensatz zur braun-violetten Färbung in o.a. Versuchen (vgl. Abb. 11 mit 9 und 1o).

Niere

Versuch 5o% pH 5,o

Durch die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im sauren Milieu von pH 5,o kommt es zur Gewebszerstörung, die eine Beurteilung der Zell-und Gewebsstrukturen unmöglich macht.

Versuch 5o% pH 6,9

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,9 kommt es ebenfalls zur Gewebszerstörung. Von daher ist die Beurteilung nicht möglich.

Versuch 3o% pH 6,5

Nach Vorbehandlung mit einer 3o%-Lösung im sauren Milieu von pH 6,5 fällt die o-DAB-Reaktion im

Vergleich zum Normalbild deutlich stärker positiv aus. Die Kapillarschlingen der Glomeruli sowie Zellen des Mesangiums sind stärker tingiert als bei der Kontrolle. Das gleiche gilt für die Bowmansche Kapsel.Die Haupt-und Überleitungsstücke sind gleichmäßig stark angefärbt. Die Sammelrohrepithelien sind dagegen mittelstark positiv tingiert. Die Gefäßwände zeigen eine sehr stark violette Tingierung.

Versuch 3o% pH 6,95

Die Vorbehandlung mit einer 3o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,95 ergibt eine erhebliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle. Es stellt sich eine braun-violette Tingierung ein. Hier und da kann eine Gewebszerstörung festgestellt werden.

Versuch 1o% pH 3,2 und pH 6,98

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung sowohl im sauren als auch im neutralen Milieu bewirkt gegenüber der Kontrolle keinen Unterschied bezüglich der Aktivität der o-DAB-Reaktion. In den Glomeruli sind die Kapillarwände sowie Zellen des Mesangiums stark angefärbt.Die Haupt-und Überleitungsstücke sind mittelstark violett tingiert. Die Gefäßwände sind gleichermaßen stark tingiert, wie bei der Kontrolle.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit Heptensäure ließ erkennen,daß die 5o% und 3o% Konzentrationen unabhängig vom pH-Wert nicht nur eine Verstärkung der o-DAB-Reaktion erzielten sondern auch eine Auflösung des Leber-und Nierengewebes verursachten.Dagegen ließ eine 1o% Konzentration unabhängig vom pH-Wert die anschließende o-DAB-Reaktion lediglich normal ausfallen (Tab. 3).

3.3.7. Maleinsäure

Leber

Versuch 1o% gelöst in Aqua dest. pH 6,8

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o% Maleinsäure-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,8 zeigt im Vergleich zum Normalbild eine wesentliche Abschwächung der o-DAB-Reaktion in allen Gewebsbereichen (Abb.12).

Versuch 5% pH 1,o und pH 6,99

Bei den mit einer 5%-Lösung vorbehandelten Schnitten im sauren und neutralen Milieu zeigt sich zwar im Vergleich zum Versuch 1o% pH 6,8 eine leichte Steigerung der o-DAB-Reaktion, aber immer noch schwächer als das Kontrollbild.

Niere

Versuch 1o% pH 6,8

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,8 stellt sich gegenüber der Kontrolle eine schwach violette Tingierung ein (Abb. 13). Dies ist besonders im Bereich der Glomeruli sowie Zellen des Mesangiums deutlich sichtbar. Die Haupt-und Überleitungsstücke sowie Sammelrohrepithelien sind gleichermaßen schwach violett angefärbt.

Versuch 5% pH 1,o und pH 6,99

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung sowohl im sauren als auch im neutralen Milieu ergibt im Vergleich zum besprochenen Versuch 1o% pH 6,8 keinerlei Tingierungs-und Differenzierungsunterschiede.

Zusammenfassung:

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit Maleinsäure unabhängig vom pH-Wert, fiel die anschließende o-DAB-Reaktion abgeschwächt aus(Tab.3).

Tabelle 3. Befunde der Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen (Halogen substituierte Verbindungen).

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
2-Brom-propen	100 %	6,9	V	V
	10 %	5,0	N-V	N
	10 %	7,0	N	N
Keten dimer	100 %	2,7	VB	VB
	50 %	5,1	VB	VB
	30 %	5,8	VB	VB
	10 %	7,7	VB	VB
Heptensäure	5o %	5,0	V	V
	50 %	6,9	V	V
	30 %	6,5	V	V
	30 %	6,95	V	V
	10 %	3,2	N	N
	10 %	6,98	N	N
Maleinsäure	10 %	6,8	A	A
	5 %	1,0	A	A
	5 %	6,99	A	A

Abb. 9
Leber. Blockungsversuch: Heptensäure, 5o%,pH 5,o.
Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Die Aktivität ist hier durch einen braun-violetten Farbton gekennzeichnet.
X 53O.

Abb. 1o

Niere. Blockungsversuch: Heptensäure, 3o%, pH 6,95.
Das Bild dokumentiert gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Die Aktivität ist hier durch eine braun-violette Färbung gekennzeichnet. X 53O.

Abb. 11
Niere. Blockungsversuch: Heptensäure, 1o%, pH 3,2.
Die Tingierung entspricht dem Kontrollbild. X 53O.

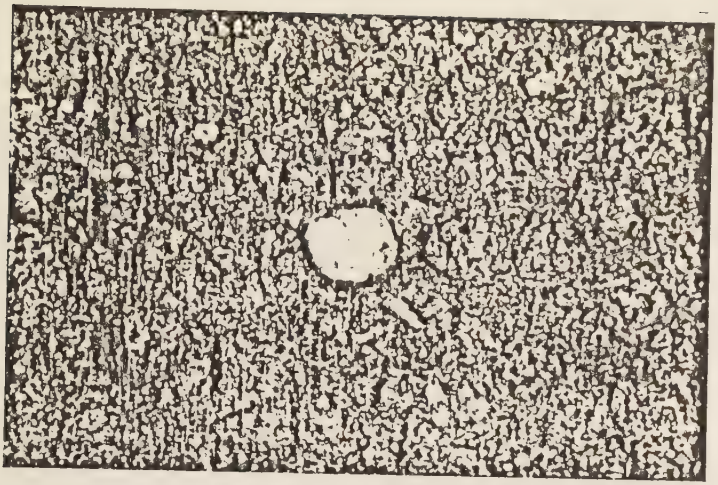


Abb. 9

Abb. 10

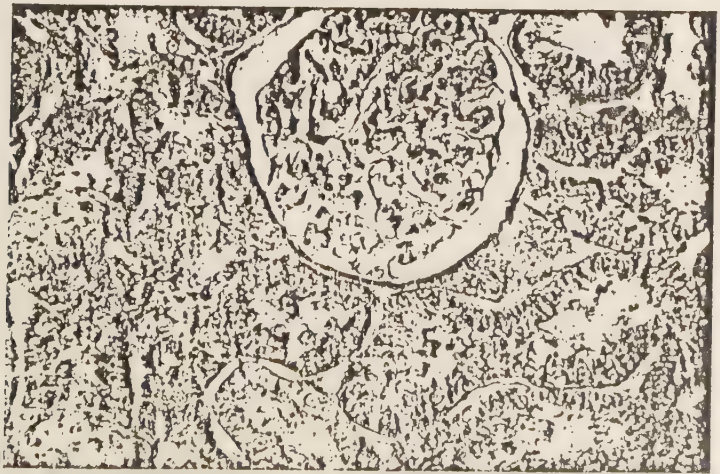


Abb. 11

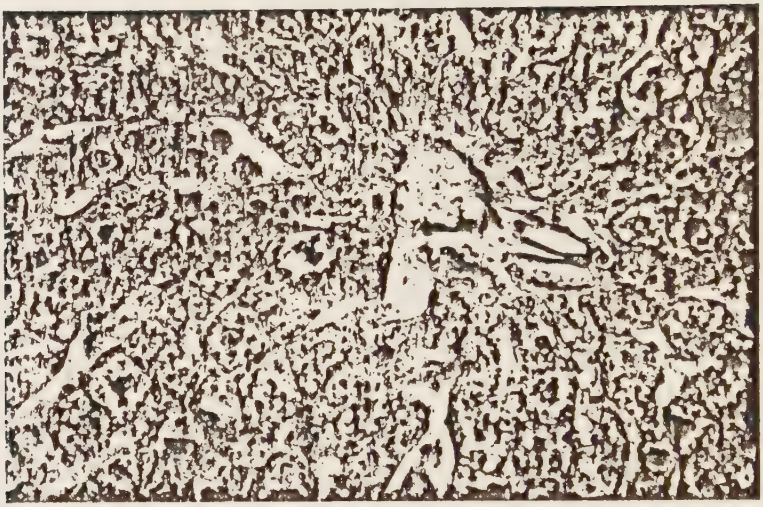


Abb. 12
Leber. Blockungsversuch: Maleinsäure, 1o%, pH 6,8. Das Bild läßt gegenüber der Kontrolle nur noch eine geringe Positivität sowie eine Veränderung des Farbtones erkennen. X 53o..

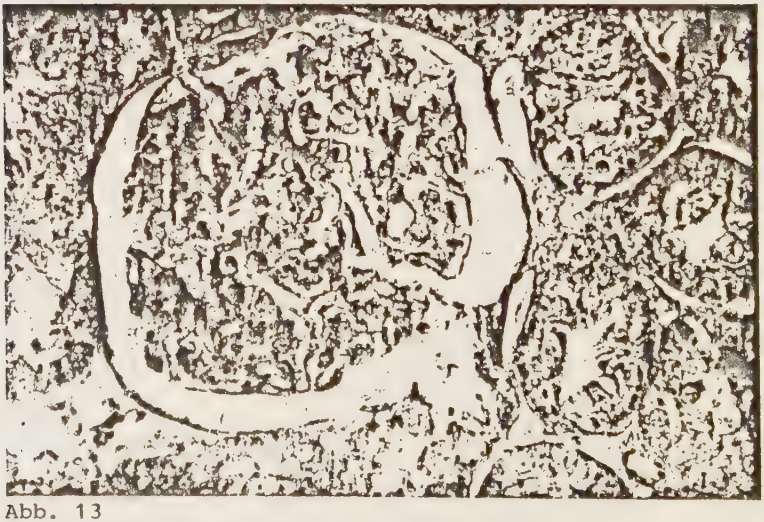


Abb. 13
Niere. Blockungsversuch: Maleinsäure, 1o%, pH 6,8. Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Abschwächung der o-DAB-Reaktion. X 53O.

3.3.8. Sorbinsäure

Leber

Versuch 5% gelöst in Äthanol-Aceton-Aqua dest.-Gemisch pH 3,4 und pH 6,85

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,4 und im neutralen Milieu von pH 6,85 ergibt im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied hinsichtlich der Tingierung sowie Zell-und Gewebsdifferenzierung.

Niere

Versuch 5% pH 3,4 und pH 6,85

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,4 und im neutralen Milieu von pH 6,85 ergibt im Vergleich zum Kontrollbild in allen Gewebsbereichen keine Abweichung der Tingierungsqualität.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit Sorbinsäure übte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluß auf den Ausfall der o-DAB-Reaktion aus (Tab.4).

3.3.9. Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz)

Leber

Versuch 3,5% gelöst in Aqua dest. pH 3,2

Bei den mit 3,5%-Lösung vorbehandelten Schnitten der Leber im sauren Milieu von pH 3,2 zeigt sich eine deutliche Abschwächung der o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle (Abb.14). Zahlreiche Kernstrukturen erscheinen schwach positiv hell-braun angefärbt.Die bindegewebigen Glissonfelder sind wesentlich schwächer angefärbt als im Normalbild. Die Gefäßwände zeichnen sich ebenfalls durch eine sehr schwach braun-violette Tingierung aus.

Versuch 3,5% pH 7,o
Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 3,5%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o bewirkt in allen Gewebsstrukturen im Vergleich zum Kontrollbild eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Diese zeichnet sich durch einen stark braun-violetten Farbton aus.

Versuch 1% pH 3,55 und pH 6,97
Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1%-Lösung sowohl im sauren Milieu von pH 3,55 als auch im neutralen Milieu von pH 6.97 bewirkt im Vergleich zum Normalbild gleichermaßen eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Die Kernstrukturen treten vergleichsweise zum Cytoplasma sehr stark positiv tingiert hervor. Das periportale Bindegewebe zeigt sich mittelstark violett angefärbt, aber wesentlich stärker als die Kontrolle. Die Gefäßwände weisen eine stark dunkelbraun-violette Anfärbung auf.

Niere
Versuch 3,5% pH 3,2
Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 3,5%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,2 fällt die o-DAB-Reaktion im Vergleich zum Normalbild wesentlich schwächer aus. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli sowie die Zellen des Mesangiums sind sehr schwach angefärbt. Das gleiche gilt für die Bowmansche Kapsel. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind schwach braunviolett tingiert. Die Sammelrohrepithelien sowie Gefäßwände zeigen ebenfalls einen schwach braunvioletten Farbton.

Versuch 3,5% pH 7,o
Bei dem mit 3,5%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o vorbehandelten Schnitt zeigt sich im Vergleich zum Normalbild in allen Gewebsbereichen

eine wesentliche Steigerung der Positivität. Diese ist durch einen stark braun-violetten Farbton gekennzeichnet (Abb.15). Eine weitere Beurteilung der Zell-und Gewebsstrukturen ist in der Relation zum Kontrollbild zu sehen.

Versuch 1% pH 3,55

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,55 fällt die o-DAB-Reaktion im Vergleich zum Normalbild wesentlich schwächer aus. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli sowie die Zellen des Mesangiums sind nur sehr schwach angefärbt. Das gleiche gilt für die Bowmansche Kapsel. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind schwach braunviolett tingiert. Die Sammelrohrepithelien sowie die Gefäßwände zeigen ebenfalls einen schwach braunvioletten Farbton.

Versuch 1% pH 6,97

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,97 bewirkt gegenüber der Kontrolle eine starke Aktivität der o-DAB-Reaktion. Die Kapillarwände in den Glomeruli, Zellen des Mesangiums und die Bowmansche Kapsel sind stark braunviolett angefärbt. Die Haupt-und Überleitungsstücke erscheinen deutlich stärker positiv als bei der Kontrolle. Die Gefäßwände sind unvermindert sehr stark braun-violett angefärbt.

Zusammenfassung:

Nach Vorbehandlung mit 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) führte ihre Lösung im sauren Bereich zur Abschwächung der anschließenden o-DAB-Reaktion, wogegen das neutrale Milieu der Lösung eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion zur Folge hatte (Tab.4).

3.3.1o Furan-2-carbonsäure

Leber (s.Tab. 4).

Versuch 1o% gelöst in Aqua dest. pH 2,53 und pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung sowohl im sauren als auch im neutralen Milieu besteht im Vergleich zum Normalbild im Bereich der Tingierung sowie Differenzierung einzelner Zell- und Gewebsstrukturen kein Unterschied.

Versuch 5% pH 2,45 und pH 7,o

Das Ergebnis der Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren sowie im neutralen Milieu entspricht weitgehend dem Kontrollbild.

Niere (s. Tab. 4).

Versuch 1o% pH 2,53 und pH 7,o

Das Resultat der Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren und neutralen Milieu entspricht hinsichtlich der Tingierung sowie Differenzierung einzelner Zell-und Gewebsstrukturen dem Normalbild.

Versuch 5% pH 2,45 und pH 7,o

Entspricht ebenfalls dem Kontrollbild. Die Vorbehandlung mit Furan-2-carbonsäure hatte im Vergleich zum Kontrollbild keinen Einfluß auf den Ausfall der o-DAB-Reaktion.

3.3.11. Furfurol

Leber

Versuch 1oo% pH o,7

Nach 1oo% Furfurol Vorbehandlung im sauren Milieu von pH o,7 stellt sich im Vergleich zur Kontrolle eine schwache braun-violette Tingierung ein, wobei eine Gewebszerstörung festgestellt werden kann. Von daher ist eine Beurteilung nicht möglich.

Versuch 1oo% pH 7,o

Die Vorbehandlung mit 1oo% Furfurol im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt im Vergleich zum Normalbild eine schwach gelbbraun-violette Anfärbung. Die Kernstrukturen sind stellenweise leicht violett angefärbt. Das umgebende Cytoplasma zeigt eine schwach bräunlich-violette Tönung. Die Gefäßwände im Bereich der Glissonfelder sowie das Bindegewebe sind ebenfalls nur schwach positiv tingiert.

Versuch 3o% gelöst in abs. Äthanol pH 2,4

Die Vorbehandlung mit 3o%-Lösung im sauren Milieu von pH 2,4 bewirkt im Vergleich zum Normalbild eine schwach gelbbraun-violette Farbtönung. Die o-DAB-Reaktion fällt in allen Gewebsbereichen schwach positiv aus.

Versuch 3o% pH 7,o

Nach Vorbehandlung mit 3o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o stellt sich ein schwach braun-violetter Farbton ein. Die o-DAB-Reaktion zeigt im Bereich der Gefäßwände eine schwache Positivität. Die restlichen Strukturen sind ebenfalls schwach tingiert.

Versuch 1o% pH 3,o

Die Vorbehandlung mit 1o%-Lösung von pH 3,o ergibt im Vergleich zum Kontrollbild eine schwach braun-violette Tingierung. Die Kernstrukturen sowie das umgebende Cytoplasma sind gleichzeitig schwach tingiert. Die Gefäßwände im Bereich der Glisson-felder sind auch schwach positiv. Das Bindegewebe erscheint nur sehr schwach angefärbt.

Versuch 1o% pH 6,95

Die Vorbehandlung mit 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,95 zeigt ebenfalls einen schwach braun-violetten Farbton. Die Kernstrukturen und das Cytoplasma

sind gleichmäßig schwach braun-violett tingiert. Die Gefäßwände im Bereich der Glissonfelder sind ebenfalls schwach positiv angefärbt. Dagegen erscheint das periportale Bindegewebe nur sehr schwach positiv.

Versuch 5% pH 6,15 und pH 7,o

Nach Vorbehandlung mit 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 6,15 sowie im neutralen Milieu von pH 7,o können im Vergleich zum 1o%-Lösung pH 6,95 keine Unterschiede bezüglich der Tingierung und Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen festgestellt werden.

Niere

Versuch 1oo% pH o,7

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 1oo%-Furfurol im sauren Milieu von pH o,7 stellt sich im Vergleich zum Normalbild eine analoge braun-violette Anfärbung ein. Im Bereich der Glomeruli ist eine Gewebszerstörung festzustellen. Die Kapillarschlingen zeigen im Gegensatz zu den übrigen Strukturen eine stark violette Tingierung. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind angegriffen, aber gleichmäßig stark braun-violett angefärbt. Die Gefäßwände sind etwas schwächer tingiert. Die Sammelrohrepithelien zeigen eine braune Farbtönung.

Versuch 1oo% pH 7,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit 1oo% Furfurol zeigen im Vergleich zum Normalbild eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion. Die Struktur der Haupt- und Überleitungsstücke ist teilweise beeinträchtigt und mäßig braun-violett angefärbt.Die Sammelrohrepithelien erscheinen etwas schwächer braun-violett und die Gefäßwände sind nur schwach violett tingiert. In den Glomeruli zeigten sich die Kapillarschlingen erheblich beschädigt, aber deutlich braun-violett positiv.

Versuch 3o% pH 2,4

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 3o%-Lösung im sauren Milieu von pH 2,4 stellt sich im Bereich der Haupt-und Überleitungsstücke und der Bowmanschen Kapsel eine mittelstarke braun-violette Tingierung ein. In den Glomeruli zeigen sich die Kapillarwände leicht braunviolett angefärbt. Die Gefäßwände sind ebenfalls leicht braun-violett tingiert. Die Sammelrohrepithelien dagegen erscheinen nur sehr schwach hellbraun-violett angefärbt.

Versuch 3o% pH 7,o

Die Vorbehandlung mit 3o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o ergibt im Vergleich zum Normalbild eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion. Im Bereich der Haupt-und Überleitungsstücke stellt sich ein hellbraun-violetter Farbton ein. Das gleiche gilt für die Bowmansche Kapsel und für die in den Glomeruli befindlichen Kapillarschlingen. Die Sammelrohrepithelien sind schwach bräunlich-violett tingiert. Im Gegensatz dazu zeigen die Gefäßwände eine mäßige Positivität.

Versuch 1o% pH 3,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,o bewirkt im Vergleich zum Normalbild eine Abnahme der Positivität im Bereich der Kapillarschlingen und der Sammelrohrepithelien. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind deutlich hellbraun-violett angefärbt. Die Gefäßwände erscheinen positiv, jedoch nur mittelstark violett tingiert.

Versuch 1o% pH 6,95

(Präparat nicht erhalten)

Versuch 5% pH 6,15 und pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 5%-Lösung im

sauren und im neutralen Milieu fällt die o-DAB-Reaktion in den Haupt-und Überleitungsstücken normal bis abgeschwächt aus. In den Glomeruli sind die Kapillarwände und Zellen des Mesangiums nur sehr schwach tingiert. Die Gefäßwände zeigen eine mittelstarke violette Anfärbung.

Zusammenfassung:
Die Vorbehandlung mit Furfurol unabhängig vom pH-Wert bewirkte im Vergleich zur Kontrolle nur eine normale bis leicht abgeschwächte o-DAB-Reaktion. Allerdings führte der 1oo% Furfurol im sauren Milieu zur partiellen Auflösung des Leber und Nierengewebes (Tab.4).

3.3.12. Phenylarsonsäure

Leber

Versuch 1o% gelöst in Aceton pH 3,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,o zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine normal bis leicht verstärkte Positivität der o-DAB-Reaktion. Die Kernstrukturen sind stellenweise stärker positiv als das umgebende Cytoplasma. Das periportale Bindegewebe ist schwach violett, aber deutlich tingiert. Die Gefäßwände zeigen eine starke Positivität.

Versuch 1o% pH 7,o

Bei den mit 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o vorbehandelten Schnitten fällt die o-DAB-Reaktion gleichermaßen stark aus, wie beim Versuch 1o% pH 3,o. Die Differenzierung entspricht dem oben beschriebenen Versuch.

Tabelle 4. Befunde der Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen.

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
Sorbinsäure	5 %	3,4	N	N
	5 %	6,85	N	N
1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz)	3,5 %	3,2	A	A
	3,5 %	7,0	V	V
	1 %	3,55	A	A
	1 %	6,97	V	V
Furan-2-carbonsäure	10 %	2,53	N	N
	10 %	7,0	N	N
	5 %	2,45	N	N
	5 %	7,0	N	N
Furfurol	100 %	0,7	N	N
	100 %	7,0	N-A	N-A
	30 %	2,4	N-A	N-A
	30 %	7,0	N-A	N-A
	10 %	3,0	N-A	A
	10 %	6,95	N-A	A
	5 %	6,15	N-A	N-A
	5 %	7,0	N-A	N-A

Abb. 14
Leber. Blockungsversuch: 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz), 3,5%, pH 3,2. Das Bild dokumentiert gegenüber der Kontrolle nur noch eine geringe Positivität sowie eine Veränderung des Farbtones X 530.

Abb. 15
Niere. Blockungsversuch: 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz), 3,5%, pH 7,o. Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion sowie eine Farbtonänderung (nach braunviolett) X 53o.

Versuch 5% pH 3,2

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,2 zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine leicht stärkere Aktivität der anschließenden o-DAB-Reaktion. Dies bezieht sich auf alle Gewebsbereiche. Die Gefäßwände erscheinen sehr stark violett angefärbt.

Versuch 5% pH 6,98

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,98 entspricht weitgehend dem Normalbild. Lediglich im Bereich der Gefäßwände zeigt sich eine Zunahme der Positivität gegenüber der Kontrolle. Alle anderen Zell-und Gewebsstrukturen entsprechen der Kontrolle.

Versuch 1% pH 3,7 und pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 1%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,7 kann im Vergleich zum Kontrollbild kein Unterschied festgestellt werden.

Niere

Versuch 1o% pH 3,o

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,o bewirkt eine leichte Verstärkung der o-DAB-Reaktion gegenüber der Kontrolle. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli und die Bowmansche Kapsel sind stark violett tingiert. Die Zellen des Mesangiums erscheinen nur schwach violett angefärbt. Ein Unterschied im Bereich der Sammelrohrepithelien und Gefäßwände im Vergleich zur Kontrolle besteht nicht.

Versuch 1o% pH 7,o

Das Ergebnis der Vorbehandlung der Schnitte mit 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o entspricht hinsichtlich der Tingierung sowie der Differenzierung einzelner Strukturen dem bereits besprochenen Versuch 1o% pH 3,o.

Versuch 5% pH 3,2

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 5%-Lösung im sauren Milieu von pH 3,2 ergibt sich im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls kein Unterschied der Anfärbung sowie Differenzierung der Zell-und Gewebsstrukturen.

Versuch 5% pH 6,98

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,98 bewirkt eine leichte Zunahme der Positivität gegenüber der Kontrolle. Die Kapillarwände in den Glomeruli und die Bowmansche Kapsel sind etwas stärker violett angefärbt als im Normalbild. Die Haupt-und Überleitungsstücke sind nur geringgradig stärker positiv angefärbt als bei der Kontrolle. Die Gefäßwände sind ebenfalls stärker violett tingiert als im Normalbild. Dagegen erscheinen die Sammelrohrepithelien nur schwach tingiert.

Versuch 1% pH 3,7

(Präparat nicht erhalten)

Versuch 1% pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 1%-Lösung im neutralen Milieu von pH 7,o fällt die o-DAB-Reaktion wie im Normalbild aus.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit Phenylarsonsäure unabhängig von pH-Wert ließ die o-DAB-Reaktion lediglich normal bis leicht verstärkt ausfallen (Tab.5).

3.3.13. Phenylarsinoxid

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer Phenylarsinoxid-Lösung (1g/in 8o ml Aceton gelöst) von pH 3,8 und pH 7,1 ergibt in allen Gewebsbereichen der Leber und Niere im Vergleich zum Normalbild keinerlei Tingierungsunterschiede (Tab.5).

Tabelle 5. Befunde der Blockungsversuche mit C-Doppelbindung enthaltenden organischen Verbindungen.

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
Phenylarsonsäure	10 %	3,0	N-V	N-V
	10 %	7,0	N-V	N-V
	5 %	3,2	N-V	N
	5 %	6,98	N-V	N-V
	1 %	3,7	N	---
	1 %	7,0	N	N
Phenylarsinoxid	1,25 %	3,8	N	N
		7,1	N	N

3.4. Blockungsversuche mit Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat.

3.4.1. Succinimid

Leber

Versuch 1o% gelöst in Aqua dest. pH 4,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,o stellt sich gegenüber der Kontrolle ein stark braun-violetter Farbton ein (Abb.16). Die Kernstrukturen sind im Vergleich zum Normalbild wesentlich stärker tingiert als das umgebende Cytoplasma. Ebenfalls stärker angefärbt erscheint das periportale Bindegewebe. Besonders deutlich fällt die o-DAB-Reaktion im Bereich der Gefäßwände aus, die sich durch einen stark dunkelbraun-violetten Farbton auszeichnen.

Versuch 1o% pH 6,97

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im neutralen Milieu von pH 6,97 bewirkt im Vergleich zum vorgehenden Versuch im sauren Milieu von pH 4,o eine weitere Zunahme der Positivität, die sich auf alle Gewebsbereiche erstreckt.

Versuch 5% pH 4,45 und pH 6,98

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung sowohl im sauren Milieu von pH 4,45 als auch im neutralen Milieu von pH 6,98 ergibt dagegen im Vergleich zum Kontrollbild keinerlei Tingierungs-und Differenzierungsunterschiede.

Niere

Versuch 1o% pH 4,o und pH 6.97

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o%-Lösung im sauren Milieu von pH 4,o und im neutralen Milieu von pH 6,97 ergibt im Vergleich zum Normalbild eine erhebliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion und Verschiebung des Farbtones nach dunkelbraun-violett (Abb.17). Dies ist besonders im Bereich der Haupt-

und Überleitungsstücke der Fall. Ein Unterschied im Bereich der Sammelrohrepithelien besteht nicht. Die Kapillarschlingen in den Glomeruli,die Zellen des Mesangiums und die Bowmansche Kapsel sind ebenfalls stark braun-violett angefärbt.Das gleiche gilt für die Gefäßwände.

Versuch 5% pH 4,45 und pH 6,98

Das Resultat der Vorbehandlung der Schnitte mit einer 5%-Lösung sowohl im sauren Milieu von pH 4,45 als auch im neutralen Milieu von pH 6,98 entspricht hinsichtlich der Tingierung sowie Differenzierung einzelner Gewebsstrukturen dem Kontrollbild. Hier fällt die Verstärkung wieder weg.

Zusammenfassung:

Die Vorbehandlung mit 1o% Succinimid unabhängig vom pH-Wert führte zur wesentlichen Verstärkung der o-DAB-Reaktion .Eine 5% Konzentration ließ keine Veränderung erkennen (Tab.6).

3.4.2. N-Bromsuccinimid

Leber, Niere

Versuch 1o% gelöst in Aceton-Aqua dest.-Gemisch pH 3,9

5% pH 3,o

1% pH 3,4

Leber, Niere

Versuch 1o% pH 6,99

5% pH 6,98

1% pH 7,o

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit allen oben genannten N-Bromsuccinimid-Lösungen im sauren sowie im neutralen Milieu stellte sich in allen Gewebsbereichen eine völlige Blockung ein, die durch eine schwach gelbe Farbtönung gekennzeichnet war (Tab. 6).

3.4.3. Phenylisocyanat

Bei den mit reinem Phenylisocyanat vorbehandelten Schnitten der Leber und Niere fiel die anschließende o-DAB-Reaktion negativ aus. Dies gilt für alle Gewebsbereiche. Die völlige Blockung war durch einen schwach hell-gelben Farbton gekennzeichnet (Tab.6).

Tabelle 6. Befunde der Blockungsversuche mit Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat.

Substanz	Konzentration	pH-Wert	Befunde	
			Leber	Niere
Succinimid	10 %	4,0	V	V
	10 %	6,97	V	V
	5 %	4,45	N	N
	5 %	6,98	N	N
N-Bromsuccinimid	10 %	3,9	VB	VB
	10 %	6,99	VB	VB
	5 %	3,0	VB	VB
	5 %	6,98	VB	VB
	1 %	3,4	VB	VB
	1 %	7,0	VB	VB
Phenylisocyanat	100 %	nicht meßbar	VB	VB

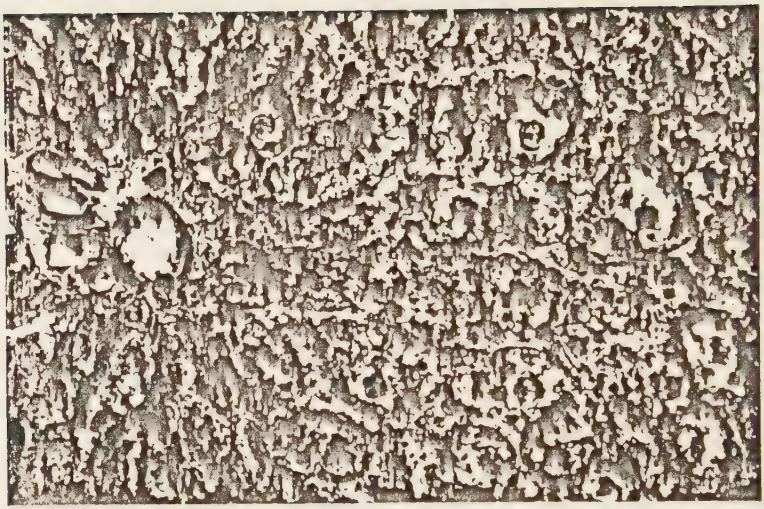


Abb. 16
Leber.Blockungsversuch: Succinimid, 1o%, pH 4,o.
Das Bild zeigt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion. X 53O.

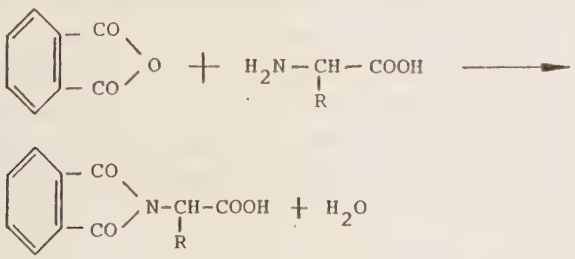
Abb. 17
Niere. Blockungsversuch: Succinimid, 1o%, pH 4,o.
Das Bild läßt gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verstärkung der o-DAB-Reaktion erkennen. X 53O.

4. Diskussion

4.1. Allgemeine Bemerkungen.

Die vergleichend-methodische Arbeit zur histochemischen Darstellung der freien Aminogruppen von Goslar (1963) dokumentiert überzeugend, daß die o-DAB-Reaktion von allen verfügbaren Nachweismethoden besonders geeignet ist. Goslar verglich die o-DAB-Reaktion anhand von Nierenschnitten mit den 3-Hydroxy-2-Naphthaldehyd-Echtblausalz B (HNA) -,der Ninhydrin-Schiff-Methode sowie der Tetrazonium- und Acrolein-Schiff-Reaktion. Die o-DAB-Reaktion übertrifft an Spezifität und geringer Veränderung des Objektes die anderen genannten; allenfalls die HNA kann ihr noch in etwa gleich gesetzt werden. Der Ninhydrin-Schiff-Reaktion ist die o-DAB-Reaktion wegen ihrer kurzen Reaktionszeit überlegen. Für die Acrolein-Schiff-Methode liegen keine eindeutige Beweise für eine elektive Erfassung freier Aminogruppen vor.

Vor der Besprechung der vorliegenden Ergebnisse scheint es wichtig, kurz auf den Reaktionsmechanismus der o-DAB-Reaktion einzugehen. Der Reaktionsmechanismus des Orthodiacetylbenzols mit freien Aminogruppen ist auch bis heute noch weitgehend unbekannt. Winkler (194o) und Wartenberg (1956) vermuteten jedoch, daß die Reaktion ähnlich der Phthalocyaninbildung mit Phthalsäureanhydrid und einer Aminosäure verläuft:-



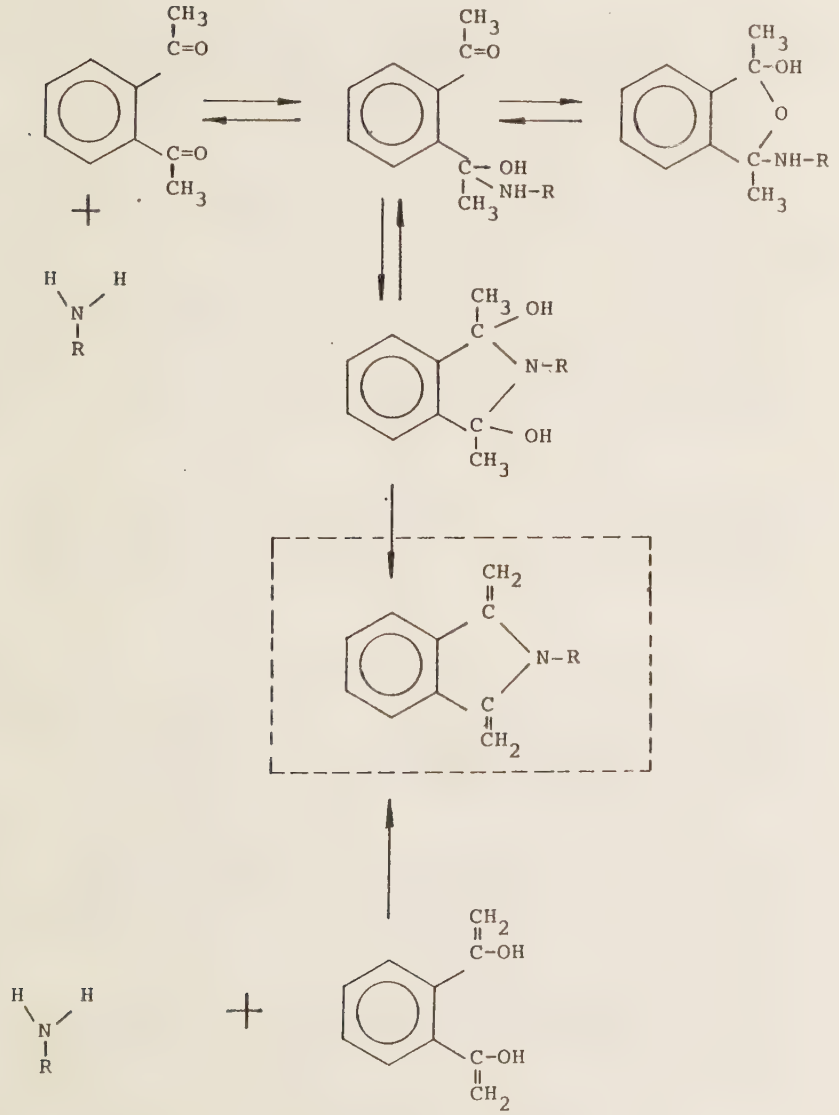
Schema 1

Bourhis et al (1972) untersuchten die Reaktionen des ortho-Diacetylbenzols mit einer Vielzahl von Primäraminen und stellten fest, daß die Verbindungen mit einer kurzen C-Kette (z.B.Methylamin) und einige primäre Diamine (Tetra-und Pentamethylenamin) zu intensiven Färbungen führen. Die Autoren konnten die gefärbten Verbindungen mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie isolieren. Schema 2 beschreibt den von Bourhis et al (1972) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus der o-DAB-Reaktion.

Neuzil et al (1973) untersuchten die Reaktionen des Phenylalanins mit dem o-DAB. Nanya und Maekawa (1978) befaßten sich mit den Färbereaktionen des o-Acetylbenzophenons und der o-DAB mit 24 Aminosäuren. Auch berichteten Lieber und Taylor (1978) über Reaktionen von Histamin mit o-DAB wobei die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie einer eingehenden Analyse unterworfen wurden. Santos et al (1979) erarbeiteten eine spektrophotometrische Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe der o-DAB-Reaktion.

Die Fixierung, die einen starken Eingriff in die morphologische und chemische Struktur des Gewebes darstellt, ist in den meisten Fällen mit einer Denaturierung des Eiweißkörpers verbunden. Nach der Darstellung von Ühlein (1956) ist der Denaturierungsprozess vor allem auf ein Auseinanderfalten und Strecken der ursprünglich gefalteten bzw. helikal angeordneten Polypeptidketten zurückzuführen. Dabei werden bestimmte Gruppen frei, die dann eine Sekundärreaktion auslösen, wie z.B. eine Koagulation der Eiweiße. Zwar werden durch die Denaturierung die Peptidbindungen nicht zerstört, es kommt jedoch zur Sprengung von H-Brücken, zur Freisetzung von Endaminogruppen, von Sulfhydrylgruppen des Cysteins und Methionins, sowie von NH_2-Gruppen des Lysins;

Schema 2. Reaktionsmechanismus der o-DAB-Reaktion, wie es von Bourhis et al. (1972) dargestellt wurde.



daraus resultiert dann die verstärkte Reaktionsfähigkeit des denatuierten Proteins (Meyer,196o). Der Einwand, daß die Orthodiacetylbenzolreaktion auf alle Aminogruppen und nicht nur auf diejenigen der Aminosäuren reagiert, trifft für eine histochemische Untersuchung nur bedingt zu, wie eingehende Modellversuche von Weygand et al (1956) nachgewiesen haben. Von den nach Fixierung im Schnitt erhaltengebliebenen Aminoverbindungen bleiben nur die Aminosäuren übrig; die niedermolekularen biogenen Amine z.B. überdauern die Wolmansche Fixierung nicht; Iminostickstoff reagiert nicht mit dem Orthodiacetylbenzol, sodaß z.B. Histidin nicht mit seinem Ring, sondern nur mit seiner Aminogruppe an der Reaktion beteiligt ist; wegen der Acylierung der Aminogruppen reagieren Aminozucker z.B. Glukosamine negativ, Cystein wird allerdings nicht erfaßt und Tryptophan wird grün tingiert (Goslar, 1963).

Die für die Blockungsversuche angewendeten organischen Substanzen können auf Grund des verschiedenen Wirkungsgrades auf die o-DAB-Reaktion im fixierten Gewebe der Leber und Niere in vier Gruppen eingeteilt werden;

a). Die erste Gruppe umfaßt 2-Propin-1-ol,Keten dimer, Phenylisocyanat,N-Bromsuccinimid nach deren Vorbehandlung der Schnitte die anschließende o-DAB-Reaktion negativ ausfiel (völlige Blockung).

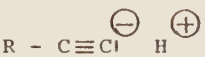
b). Die zweite Gruppe zeigt nach Vorbehandlung mit Maleinsäure, 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) und Furfurol im Vergleich zum Kontrollbild eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion.

c). Zur dritten Gruppe zählen 3-Butin-2-ol,2-Brom-2-propen-1-ol,Furan-2-carbonsäure,Phenylarsonsäure und Phenylarsinoxid, die im Vergleich zur Kontrolle keine oder nur geringgradige Abschwächung in der Aktivität der o-DAB-Reaktion bewirken.

d). Der vierten Gruppe gehören Allylalkohol, 3-Brom-1-propen, 2-Brom-propen,Heptensäure,Succinimid an, derer Vorbehandlung der Schnitte zur Verstärkung der anschließenden o-DAB-Reaktion führen.

4.2. Besprechung der Ergebnisse über C-Dreifachbindung enthaltende organische Verbindungen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß das 2-Propin-1-ol bei einer Konzentration von 1oo% und 5o% die o-DAB-Reaktion blockierte, während das 3-Butin-2-ol höchstens eine leichte Abschwächung der o-DAB-Reaktion aufwies. Die blockierende Wirkung nimmt also mit Länge der C-Kette ab. In der Literatur ist über eine Blockungsreaktion von primären Aminogruppen durch Dreifachbindung und Ausfall der o-DAB-Reaktion nichts bekannt. Bei der C-Dreifachbindung ist eine Protonabspaltung möglich, die die Substanz an den Stickstoff verbindet. (Wulff, persönliche Mitteilung,1983).



4.3. Besprechung der Ergebnisse über C-Doppelbindung enthaltende Alkohole bzw. Halogen substituierte Substanzen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß nur Keten dimer die o-DAB-Reaktion völlig blockieren kann. Diese Wirkung scheint unabhängig vom pH-Wert und Konzentration zu sein. Keten dimer gehört zu den reaktionsfähigsten Stoffen der organischen Chemie (Karrer (1942),Fieser und Fieser,(1968). Ihren ungesättigten Charakter verdanken die Ketene dem System kumulierter Doppelbindungen.

Wasser führt die Ketene in Säuren,Ammoniak in Säureamide über. Die Blockung scheint also hier auf der Bildung einer säureamidartigen Verbindung zu beruhen.

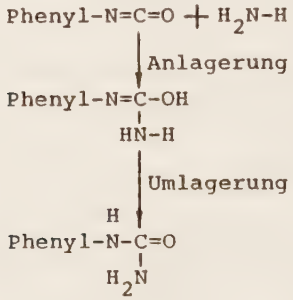
Folgende Doppelbindung enthaltende 3 Substanzen führten zur geringgradigen Abschwächung der o-DAB-Reaktion: Maleinsäure, 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) und Furfurol. Während 3-Brom-1-propen, 2-Brom-2-propen-1-ol, Sorbinsäure, Furan-2-carbonsäure und Phenylarsinoxid keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zeigten, führten Allylalkohol und Heptensäure zur deutlichen Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Hier kann eine Erklärung bisher nicht gegeben werden.
Nach Goslar (1963) läßt eine Vorbehandlung der Schnitte mit N-Äthylmaleimid - einem - SH- Blocker mit einer Doppelbindung - die o-DAB-Reaktion ebenfalls negativ werden; da im N-Äthylmaleimid sonst keine mit Aminogruppen in Reaktion tretende Bereiche gegeben sind, muß das Negativwerden der o-DAB-Reaktion auf die vorhandene Doppelbindung zurückgeführt werden. Hier ist eine Aktivierung der Doppelbindung in Folge der Nachbarschaft von 2 Carbonylgruppen durchaus wahrscheinlich und damit eine Blockungsreaktion wie bei den Sulfhydrylgruppen möglich.
In der von van Duijn (1961) angegebenen Weise führte die Vorbehandlung mit Acrolein zur vollständigen Blockierung der o-DAB-Reaktion. Goslar (1963) stellte dabei fest, daß nicht nur alleine die Doppelbindung, sondern auch die Aldehydgruppe wesentlich beteiligt sein müßte. Diese Feststellung wird durch Anwendung eines entsprechenden Aldehyds mit gleicher Kohlenstoffatomzahl, aber ohne Doppelbindung (Propionaldehyd) unterstützt. Auch diese Verbindung läßt die o-DAB-Reaktion negativ werden. Die Vorbehandlung der Schnitte mit Propionaldehyd ergab andererseits keine positive Schiffreaktion mehr, weil die Aldehydgruppen am Amin gebunden sind, zum anderen nicht in die Reaktion eingegangener Propionaldehyd

herausgelöst ist. Eine adsorptive Anlagerung an Gewebeteile ist weder beim Propionaldehyd noch beim Acrylaldehyd bekannt. Die Verbindung mit der NH_2-Gruppe in den Gewebsstrukturen ist somit nicht nur auf seine Doppelbindung zurückzuführen (Goslar,1963, vergl. van Duijn, 1961); und der konkurierende Einfluß der Aldehydgruppen zu berücksichtigen.
Bei C-Doppelbindung der Substanzen: Allylalkohol, 3-Brom-1-propen, 2-Brom-propen, Heptensäure und Succinimid, die eine Verstärkung aufwiesen, muß man die Ionisierung der aktiven Gruppen berücksichtigen. Ihre Ladung kann sich unter Destabilisierung der Doppelbindung auf das mittlere C-Atom verschieben und dann die Anlagerungsfähigkeit an nukleophilen CH_2-Gruppen herbeiführen.

4.4. Besprechung der Ergebnisse über Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat.

Die Vorbehandlung der Schnitte mit einer 1o% Succinimid-Lösung führte sowohl bei einem sauren als auch neutralen pH-Wert zur Verstärkung der o-DAB-Reaktion. Eine Verringerung der Konzentration zeigte keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Das N-Bromsuccinimid wies dagegen unabhängig von Konzentration und pH-Wert eine völlige Blockung der o-DAB-Reaktion auf. Die vorliegenden Ergebnisse über die Verwendung von N-Bromsuccinimid stimmen mit den oben angegebenen Daten von Geyer (1963) überein; sogar eine 1% Konzentration des N-Bromsuccinimids hatte unabhängig vom pH-Wert zur völligen Blockung der o-DAB-Reaktion geführt. Der Blockungsmechanismus des N-Bromsuccinimids beruht auf einer oxydativen Desaminierung der NH_2-Gruppen oder auf Bildung einer substituierten Hydrazinstruktur (Geyer,1963). Untersuchungen von Geyer führten zur Schlußfolgerung, daß die N-Bromsuccinimd-Vorbehandlung die o-DAB-Reaktion vollständig blockiert.

Im Falle von Phenylisocyanat, führte höchstwahrscheinlich die kumulierte Doppelbindung (-N=C=O) zur völligen Blockung der freien Aminogruppen; eine kumulierte Doppelbindung ist bekanntlich die Ursache der erhöhten Reaktionsfähigkeit der Substanz (Fieser und Fieser, 1968).
Diese Verbindung bildet mit Ammoniak einen Phenylharnstoff, der im vorliegenden Falle noch durch den an den NH_2-Gruppen hängenden Rest substituiert ist:



Einige Autoren haben verschiedene anorganische Substanzen angewendet und deren Einfluß auf die o-DAB-Reaktion untersucht. Bei Einwirkung von salpetriger Säure verschwindet die Färbung mit o-DAB-Reaktion völlig wegen Zerstörung der NH_2-Gruppen (Goslar, 1963).
Nach Mäddy (1961), Goslar (1963) und Pearse (1968) führte die Vorbehandlung mit Dinitrofluorbenzol zur völligen Blockung der o-DAB-Reaktion. Beim Einsatz von Benzoylchlorid findet nach Goslar (1963) z.B. im Zellkernbereich von Nierenschnitten keine völlige Blockung der freien Aminogruppen, sondern nur eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion statt. Ebenfalls nach Oxidation der Schnitte mit einer sauren Kaliumpermanganatlösung und Blockierung entstandener Aldehydgruppen mit Hydroxylaminlösung (Prüfung auf Vollständigkeit mit Schiffsreagenz) mindert sich die o-DAB-Reaktion geringgradig (Absprengung-NH_2-haltiger Seitenketten?) (s.Goslar,1963). Auch Bromwasser, das sonst zur Blockierung der Doppelbindung angewandt wird (Pearse,1968) scheint mit den freien Aminogruppen unter Bildung von N-Bromaminen in eine Reaktion einzugehen; (Goslar,1963).

4.5. Anmerkungen zu den methodischen Parametern.

Das Ergebnis einer Reaktion hängt bekanntlich von mehreren Bedingungen ab; u.a. wesentlich von der Konzentration einer Lösung und deren pH-Wert.

Die Vorbehandlung der Schnitte mit 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) zeigte, daß die im neutralen Bereich angesetzte Lösung im Vergleich zur gleichkonzentrierten Lösung im sauren Milieu zu einem erheblichen farblichen Unterschied führte. Hier ergab sich im Falle des sauren Bereiches eine deutliche Abschwächung der Positivität am Gewebsschnitt (Abb.14), wogegen im neutralen Milieu eine Zunahme der Tingierung resultierte (Abb. 15).

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigten, führte die Vorbehandlung der Leber-und Nierenschnitte mit einem 1oo% 2-Propin-1-ol im sauren sowie neutralen Bereich zur völligen Blockung. Dagegen ließ 5o% und 25%- Konzentrationen des gleichen Alkohols unabhängig von pH-Wert die o-DAB-Reaktion zwar schwächer, aber positiv ausfallen. Die Vorbehandlung mit 5% pH 7,o hatte keine Blockungswirkung mehr zur Folge und entsprach hinsichtlich der Tingierung dem Normalbild. Ein weiteres Beispiel für den Einfluß der Konzentration auf den Ausfall der o-DAB-Reaktion stellt sich im Versuch mit Allylalkohol dar. Hier war ein stark dunkelbraun-violetter Farbton zu sehen. Diese Versuchsreihe zeigte, daß bei absteigenden Konzentrationen unabhängig vom pH-Wert eine kontinuierliche Abnahme der Positivität am Gewebsschnitt erfolgt.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigten, würde nach Vorbehandlung mit Heptensäure sowie mit 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) eine Farbveränderung beobachtet (s.Abb.9,1o,11 und 14,15).

Nach der Untersuchung von Bourhis et al (1972) wären die Farbunterschiede durch einen unterschiedlichen Reaktionsablauf und daraus entstehenden unterschiedlichen Komponenten erklärbar.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen einmal die

außerordentlich hohe Spezifität der o-DAB-Reaktion. Sie zeigen zum anderen die starke Reaktionsfähigkeit der freien primären Aminogruppen und bieten schließlich auch eine Erklärung für die Toxizität der hier besprochenen Substanzen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Substanzen der folgenden Gruppen hinsichtlich ihrer Blockungseignung bei der histochemischen Darstellung freier NH_2-Gruppen mittels der o-DAB-Reaktion anhand von Leber- und Nierenschnitten der Wistarratte, die nach Wolman fixiert waren, zu untersuchen:

1). C-Dreifachbindung enthaltende organische Verbindungen
2). C-Doppelbindung enthaltende organische Verbindungen (Alkohole bzw. Halogen substituierte Verbindungen).
3). Succinimid, N-Bromsuccinimid und Phenylisocyanat

Zum Nachweis der freien NH_2-Gruppen dienten ca. 6 µm dicke Paraffinschnitte, die nach 4-stündiger Vorbehandlung bei Raumtemperatur und der anschließenden o-DAB-Reaktion nach der Methode von Wartenberg (1956) unterzogen wurden. Die Intensität der o-DAB-Reaktion wurde lichtmikroskopisch in 4 Graden semiquantitativ ausgewertet (völlige Blockung, Abschwächung, keine Veränderung gegenüber der Kontrolle, Verstärkung).

Die angewandten Substanzen können je nach ihrer Wirkung auf die histochemische o-DAB-Reaktion in folgende 4 Gruppen eingeteilt werden:

1). 2-Propin-1-ol, Keten dimer, Phenylisocyanat und N-Bromsuccinimid führten zur völligen Blockung der freien NH_2-Gruppen.

2). Maleinsäure und 1,2 Naphthochinon-4-sulfonsäure (Natriumsalz) bewirkten lediglich eine Abschwächung der o-DAB-Reaktion.

3). 3-Butin-2-ol, 2-Brom-2-propen-1-ol, Furan-2-carbonsäure, Furfurol, Phenylarsonsäure und Phenylarsinoxid zeigten gegenüber der Kontrolle keine Veränderung der o-DAB-Reaktion.
4). Allylalkohol, 3-Brom-1-propen, 2-Brom-propen, Heptensäure und Succinimid verursachten eine Verstärkung der o-DAB-Reaktion.

Die Ergebnisse dokumentieren sowohl die hohe Spezifität der o-DAB-Reaktion als auch die außerordentliche Reaktionsfähigkeit der freien Aminogruppen. Die Gründe für die unterschiedlichen Blockungsergebnisse wurden diskutiert und dabei besonders das Verhalten der C-Doppelbindung herausgestellt.

Literaturverzeichnis
==========

Bourhis,M.,Jensen,H.,Neuzil,E.: Recherches sur 1 ortho-diacetylbenzene,rearctif des groupements amines.Annales pharmaceutiques francaises, 3o, 55-64 (1972).

Buddecke,E.,: Grundriss der Biochemie,Walter de Gruyter & Co.Berlin, 5. Aufl. 47-92 (1977).

Chu,C.H.U.,Folgelson,M.A., and Swinyard,C.A.,: (1953) zitiert nach Pearse 1968).

Danielli,J.F.: (1947); zitiert nach Pearse,1968).

Danielli,J.F.: (195o); zitiert nach Pearse,1968).

Dietz,E.: Beobachtungen über die o-Diacetylbenzol Eiweißfarbreaktion, insbesondere ihr Verhalten gegenüber Kristalloiden der Hodenzwischenzellen. Z. mikr.-anat.Forsch. 51, 14-24 (1942).

Duijn,P.A.van.: Acrolein-Schiff, a new staining method for proteins.J.Histochem.Cytochem.9, 234-241 (1961).

Fieser,L.F.,Fieser,M.: Organische Chemie; S. 452,455, 462,478,648,868, Verlag Chemie GmbH Weinheim (1868).

Fórth,W.,Henschler,D.,Rummel,W.:Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie Wissenschaftsverlag Mannheim, S. 585,6oo,618,(198o).

Fotakis,N.S.: Eine Modifikation des a-Aminosäure-Nachweises mit Ninhydrin bzw.Alloxan. Histochemie 2, 43-47 (196o).

Geyer,G.: Zur Verwendung von N-Bromsuccinimid als histochemisches Reagenz. Acta histochem. 16, 357-374 (1963).

Goslar,H.G.: Kritisches zur Erfaßung der freien Aminogruppen fixierter Proteine. Ein Vergleich verschiedener Methoden mit der o-Diacetylbenzol-Reaktion nach Voss. Histochemie 3, 249-256 (1963).

Karrer,P.: Lehrbuch der organischen Chemie,Thieme Verlag, Leipzig, 191-193 (1942).

Lieber,E.R.,Taylor,S.: Comparison of thin-layer chromatographic detection methods for histamine from food extracts.Journal of Chromatography, 16o, 227-237 (1978).

Maddy,H.: 1-Fluoro-2-4-Dinitrobenzene as a cytochemical reagent.Exp.Cell.Res.22, 181-192 (1961).

Meyer,Ch.: Der Einfluß der Fixierung auf den Ausfall der o-Diacetylbenzol-Reaktion. Acta histochem.Bd.9, 11-65 (196o).

Nanya,S.,Maekawa,E.: Reaction of o-diacetylbenzenes with amino acids and human skin.Nagoya Kogya Daigaku Gakuho 29,191-196 (1978).

Neuzil,E.,Jensen,H.,Bourhis,M.: Ortho-diacetylbenzene, reagent for amine groups,Reaction with phenylalanine. Bul.Soc.Pharm.Bordeaux,112,11-17,(1973).

Pearse,A.G.E.: Proteins and Amino-acids.In: Histochemistry, Theoretical and Applied.J.A.Churchill,(London) Bd.1 1o6-179 (1968).

Porter,R.R.: (195o); zitiert nach Pearse (1968).

Romeis,B.: Mikroskopische Technik, R. Oldenbourg, München,S.225,(1968).

Sanger,F.:(1945); zitiert nach Pearse (1968).

Santos,A.,Berneira,C.,Zaira,da,C.,Schenkel,A.,Wilde,F.: Spectrophotometric determination of amino acids with o-diacetylbenzene.Part.I.Determination of L-histidine and DL-methionine.Rev.Cent.Cienc.Saude, 1-2,97-119, (1979).

Springall,H.D.: (1954); zitiert nach Pearse (1968).

Stoward,P.J.: (1963); zitiert nach Pearse (1968).

Ühlein,E.: (1956); zitiert nach Pearse (1968).

Voss,H.: Eine neue Eiweißreaktion und ihre histochemische Anwendbarkeit. Z.mikr.-anat.Forsch. 49,51-57,(1941).

Wartenberg,H.: Die Spezifität des o-Diacetylbenzols bei seiner Anwendung als Reagenz auf freie Aminogruppen von Proteinen und Aminosäuren.Acta histochem. 3, 145-163,(1956).

Weiss,L.P.,Tsou,K.,Seligmann,A.M.: Histochemical demonstration of protein-bound amino groups.J.Histochem. Cytochem.1, 386-387 (1953).

Weiss,L.P.,Tsou,K.,Seligmann,A.M.: Histochemical demonstration of protein-bound amino groups.J.Histochem. Cytochem.2, 29-49 (1954).

Weygand,F.,Weber,H.,Maekane,E.,Eberhardt,G.: Über den Nachweis von aliphatischen und aromatischen primären Aminen mit o-Diacetylbenzol.Chem.Ber.89,1994-1997 (1956).

Winkler,W.: Über das 1,2 Diacetylbenzol.Chem.Ber.81, 256-259, (1948).

Wolmann,M.,and Behar,A.; A method of fixation for enzym-cytochemistry and cytology.Exp.Cell.Res.3,619(1952); (zitiert nach Romeis,1968).

Wulff,G.: persönliche Mitteilung (1983).

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. med. H.G. Goslar bin ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie für die freundliche Anleitung verbunden.

Herrn Prof. Dr.G.Wulff, Lehrstuhlinhaber des Institutes für organische Chemie, danke ich für kritische Anmerkungen zum Mechanismus der o-DAB-Reaktion.

Herrn Dr. S.G. Haider möchte ich sehr für seine wissenschaftliche und methodische Betreuung danken.

Frl.Berthold, Frau Baasen und Herrn Faßbender danke ich für wertvolle und technische Hinweise.

L E B E N S L A U F

Am 17. Juli 1949 wurde ich,Henryk Gelbert, als Sohn der Zahnärztin Halina Gasiewicz, geb. Gelbert und ihres Ehemannes,des Zahnarztes Henryk Gasiewicz, in Lodz/ Polen geboren. Ich habe zwei Geschwister, die ältere Schwester ist Fachärztin für Anästhesie und die jüngere Schwester studiert z.Z. Zahnmedizin.

Von 1956-1963 besuchte ich die Grundschule in Skarzysko-Kam./Polen.

Von 1963-1967 besuchte ich die Oberschule in Skarzysko-Kam., die ich mit Abitur abschloß.

Im Jahr 1967 nahm ich das Studium an der Technischen Hochschule in Tschenstochau/Polen auf und studierte dort bis 1971. Im gleichen Jahr setzte ich das Studium an der Technischen Hochschule Karl-Marx-Stadt/DDR fort, das ich im Dezember 1975 mit Diplom beendete.

Seit April 1976 lebe ich in der Bundesrepublik Deutschland. Im Herbst 1977 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Universität Düsseldorf, im Obtober 1982 absolvierte ich das Staatsexamen.

1982 heiratete ich die cand.med.Jeannete Bogdanov; am 28.Dez.1982 wurde mein Sohn Henryk,Jan,Karol Gelbert geboren.

Düsseldorf, Juni 1983.